BCU V - 6554

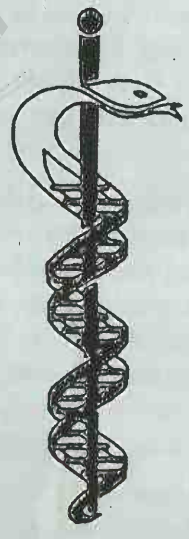
Mircea Covic,
Dragoş Ştefănescu, Ionel Sandovici

GENETICĂ MEDICALĂ

99 lei

Ediţia a II-a revăzută şi actualizată

Cuvânt înainte de Mircea Maliţa şi Nicolae Cajal



000007 551525
BCU Iaşi

POLIROM
2011

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUVÂNT ÎNAINTE

Impozanta lucrare *Genetică medicală*, un adevărat tratat, inspiră respect şi apreciere pentru stăruinţa şi competenţa cu care un corp de elită ştiinţifică aduce contribuţii semnificative şi preţioase la dezvoltarea acestui domeniu. Din conţinutul cărţii înţelegi mai bine de ce genetica ocupă astăzi un loc de regină între celelalte ştiinţe bio-medicale. În plus, bogatele aplicaţii la tratarea maladiilor arată că din abordările teoretice şi din datele furnizate de investigaţiile clinice şi de laborator decurg învăţăminte medicale imediate, spre beneficiul bolnavilor.

Venind din orizontul altei sfere de cercetare, aş vrea doar să semnalez interesul şi nerăbdarea altor domenii de a beneficia de rezultatele geneticii. Este cunoscut faptul că în zilele noastre s-a deschis frontul „molecular" îndreptat spre cunoaşterea structurii creierului, a funcţionării minţii, a proceselor de memorie şi învăţare, a determinărilor comportamentale. Pentru prima oară un asemenea program are o poziţie centrală, iar rezultatele sale nu întârzie să se răsfrângă asupra tuturor ştiinţelor secolului nostru. Ştiinţele sociale şi umane, cele ale relaţiilor internaţionale, economice şi istorice îşi dau seama că, bine-rău cum au lucrat până acum, nu au la baza propriilor lor teorii decât un temei tentativ şi speculativ, de vreme ce enigmele persistă în „cutia neagră" nedeschisă până acum. Genetica aduce lumina pe care autorii acestei remarcabile lucrări s-au străduit – cu deplin succes – să o difuzeze.

În esenţă, progresele celor care lucrează în ştiinţele umaniste depind de ceea ce le vor dezvălui genetica, biologia şi chimia, în speţă, bio-chimul, cum numesc unii umbrela lor. Cercetări recente semnalează faptul că unele animale transmit urmaşilor lor nu doar dispoziţiile fixe ale construirii organelor şi ale asamblării lor într-un organism funcţional, şi nici numai instinctele care le vor călăuzi viaţa. Mai există un ansamblu de trăsături transmisibile ereditar: dispoziţii sau înclinaţii comportamentale, pe care apoi se clădesc reflexe condiţionate puternice. Dacă sunt prezente şi la oameni, înseamnă că ei dispun ereditar de instrumente noi de sprijin. Alte aspecte neelucidate aşteaptă să fie descifrate: memoria sub-conştientă în toate formele ei, formarea mentalităţilor şi opiniile de masă, factorii ce ar trebui încurajaţi sau atenuaţi pentru ca procesele învăţării să fie rodnice şi durabile, şi altele. I se atribuie omenirii multe păcate, care, dacă ar fi mai bine cunoscute, ar putea fi corectate: este oare iremediabil greu guvernabilă, recurgerea la violenţă este o componentă irezistibilă, incapacitatea de a învăţa din erori este o slăbiciune de construcţie sau se poate ameliora? O speranţă autentică este genetica şi, mai ales, epigenetica, prin care intervenţiile mediului pot modula exprimarea tiparelor biologice.

Volumul de faţă dă speranţe acestor preocupări, furnizând o pletoră de informaţii recente despre genomul uman. Am apreciat expunerea deosebit de interesantă a corelaţiilor geneticii cu unele probleme de biologie şi psihosociologie umană: importanţa conceptului de unicitate genetică şi biologică în educaţie şi viaţa socială, evoluţia omului „*out of Africa*" şi co-evoluţia gene-cultură, diversitatea populaţiilor umane, dilemele şi conflictele etice generate de genetică. Elementul cel mai inedit şi surprinzător, pentru mine, îl reprezintă însă noua eră a medicinei genomice, o medicină care pe baza geneticii devine personalizată, predictivă şi preventivă. O menţiune specială se cuvine a fi făcută cu privire la stilul unitar, concis, clar şi elegant în care este redactată lucrarea şi care facilitează înţelegerea şi asimilarea conceptelor prezentate.

Îmi exprim încrederea că medicii şi cercetătorii care au realizat cartea, precum şi cei care îşi vor îmbogăţi cunoştinţele citind-o vor contribui atât la dezvoltarea geneticii medicale, cât şi la elucidarea unor procese de care depinde în fapt cunoaşterea omului. Volumul de faţă încurajează o largă arie de investigaţii ce caută temeiuri solide pentru studierea ei, iar autorii lui merită, şi prin acest fapt, întreaga noastră preţuire şi recunoştinţă.

Bucureşti, mai 2011

Academician Mircea Maliţa

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUVÂNT ÎNAINTE
la ediția I

Medicul este un „*perpetum... studentum*" – care absoarbe necontenit „energia" informațiilor recente și o folosește în activități practice noi, cu eficiență sporită. Se întâmplă însă uneori ca avalanșa și diversitatea noutăților să depășească posibilitățile de asimilare, generând un „blocaj" și secundar „o frustrare". Așa s-a întâmplat și cu genetica medicală, mai ales în „varianta" ei moleculară, în care achizițiile conceptuale și aplicațiile practice au evoluat cu o viteză mai mare decât capacitatea de recepție a multor medici, transformând medicina actuală într-o medicină moleculară sau, după o sintagmă adecvată, în *medicină genomică*. Necesitatea de a explica noile concepții, pentru a fi asimilate și folosite în practica medicală, a determinat prestigioasa revistă săptămânală *New England Journal of Medicine* să inaugureze (în noiembrie 2002) o secțiune permanentă dedicată medicinei genomice. Am folosit acest exemplu pentru a sublinia actualitatea, necesitatea și utilitatea *Geneticii medicale* – editată de M. Covic, D. Ștefănescu și I. Sandovici – care va fi fără îndoială o carte de referință în medicina românească.

Lucrarea *Genetică medicală* este de fapt *un mic tratat* care abordează în 20 de capitole și circa 700 de pagini toate problemele majore ale geneticii umane (ca disciplină fundamentală) și medicale (ca disciplină aplicativă). Lucrarea reprezintă rodul muncii temeinice a celor 3 autori principali și a celor 19 colaboratori, din 7 centre universitare, putând fi considerată *o lucrare reprezentativă pentru medicii geneticieni din România.*

În acest tratat este abordată *întreaga problematică a domeniului*: structura și funcțiile materialului genetic, mutațiile și genetica populațiilor; rolul factorilor genetici în producerea bolilor; consultul, explorarea și sfatul genetic; categoriile mari de boli genetice (inclusiv bolile comune ale adultului și cancerul); profilaxia și tratamentul bolilor genetice; problemele și dilemele etice ale geneticii medicale. Deci toți cei interesați de genetica medicală în pregătirea lor (studenți, rezidenți) sau în activitatea lor practică (medici de familie, diverși specialiști) vor găsi explicații și informații prețioase. De menționat că bibliografia selectivă specifică fiecărui capitol (ce cuprinde articole de referință recente) este dublată de adrese de internet, de la care se pot obține noi detalii; acest mod de extensie potențială a cunoștințelor, pe baza cărții, este unic în literatura noastră de specialitate.

Lucrarea are un conținut modern, foarte actual, bazat pe o documentare profundă – la nivelul anului 2003. Se remarcă un echilibru perfect între partea fundamentală și aplicativă, între esențial și detalii, dovedind nu numai o foarte bună cunoaștere a problematicii, un nivel științific remarcabil, ci și o reală artă a scrisului, caracterizată prin concizie, claritate și eleganță. Mi se par demne de subliniat structura și stilul științific unitar (inclusiv în planul terminologiei) în care sunt realizate toate capitolele, precum și exprimarea experienței personale a autorilor și colaboratorilor, mai ales din partea de genetică clinică. Formatul și tehnoredactarea îngrijită a cărții de către Editura Polirom din Iași, numărul figurilor (jumătate fiind originale) și calitatea lor aduc un spor de profesionalism și calitate. Se poate afirma, fără rezerve, că *Genetica medicală* este cea mai bună carte din acest domeniu, publicată până în prezent. Sunt absolut convins că această carte va fi utilă tuturor *studenților și rezidenților, precum și specialiștilor din diferite domenii*, confruntați cu probleme de patologie genetică, care – la fel ca și mine – vor aprecia fără rezerve această lucrare.

București, ianuarie 2004

Academician Nicolae Cajal

BCU IAȘI CENTRU VECHI LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PREFAȚĂ

Realizarea celei de a doua ediții a „Geneticii medicale" a reprezentat pentru noi *o provocare* deoarece în intervalul relativ scurt care s-a scurs din momentul publicării primei ediții s-au produs în acest domeniu progrese tehnice și științifice importante. Astfel, în 2004 a fost finalizat „Proiectul genom uman" și a fost publicată versiunea *finisată* a secvenței de referință a genomului uman (cu o precizie de 99,9%), inaugurându-se oficial *era genomicii* și a *medicinei genomice*. Ulterior a fost efectuată resecvențierea, cu noi tehnologii, a fiecărui cromozom uman și, în 2007, secvența întregului genom a fost declarată „încheiată", deși, evident, au urmat și vor urma noi finisări și completări. Deși structura genomului uman este acum descifrată, înțelegerea funcției și reglării tuturor genelor, precum și a rolurilor ADN necodant este departe de a fi completă; ne găsim în etapa de „adnotare a genomului uman" – un proces complex, dificil și de durată deoarece presupune „*o decriptare*" a secvenței liniare a genomului uman, necesară pentru *a da un sens și a interpreta* semnificația diferitelor categorii de elemente genomice.

După 2004, într-o perioadă relativ scurtă, progresele tehnologice au fost deosebite; noile tehnici de secvențiere masivă, paralelă a ADN (cu reducerea importantă a costului și timpului secvențierii întregului genom), genotiparea pe microrețele de ADN, ce permite studii la nivelul întregului genom (GWAS), metodele de analiză aprofundată ale transcriptomului și proteomului – toate dublate de programe bioinformatice sofisticate (genomica *in silico*) – au schimbat modul de abordare și direcțiile de cercetare în genetica medicală. Dar poate mai important este faptul că noua revoluție tehnologică influențează profund *modul de a gândi* în genetica umană. Datele acumulate ne obligă să revizuim unele dintre ideile fundamentale ale geneticii. Trei elemente inedite – definite pe scurt „*ARNom*", „*variom*" și „*epigenom*" – sunt absolut surprinzătoare prin consecințele lor.

- Descoperirea unor clase noi de gene ARN, care însumează acum circa 8.500 de gene, și faptul că aproape 85% din ADN este transcris în ARN necodant, cu funcții încă incomplet cunoscute, conduc la ideea că genomul este mai curând *o mașină de fabricat ARN decât o mașină de proteine* (cele 21.500 de gene pentru proteine acoperind doar 1,5% din genom) și ne obligă să redefinim gena ca *o asociere de secvențe genomice care codifică un set coerent de produse finale funcționale, proteine și ARN*.
- Polimorfismul important al numărului de copii al unor secvențe ADN (CNV sau CNP), polimorfismul ARN necodant (scurt sau lung) și cele aproape 18 milioane de polimorfisme mononucleotidice (SNPs) ne impun să acceptăm ideea *variabilității enorme a genomului uman*, la populații și persoane diferite, cu consecințe medicale deosebite.
- Modificările epigenetice, numeroase și variate, nu implică modificări ale secvențelor nucleotidice, dar influențează profund expresia spațială și/sau temporală a genelor noastre, în anumite condiții de viață; fiecare tip celular are o stare epigenetică particulară, *un epigenom specific*.

Numeroasele achiziții privind structura și funcția genomului uman au consecințe și aplicații majore în teoria și practica medicală, care, în ansamblul lor, inaugurează *era genomicii în medicină*. Se trece astfel de la *genetica medicală* – care analizează gene izolate și efectele lor la un număr relativ mic de persoane (5-8% din nou-născuți) – la *medicina genomică*, care studiază funcția și interacțiunile genelor din genom și ale genomului cu mediul – la toți oamenii. Medicina genomică este o medicină individualizată, în esență predictivă, personalizată și preventivă.

În aceste condiții de progres amplu și continuu, realizarea noii ediții a fost, cum spuneam, o provocare deoarece am fost obligați să procesăm și să coroborăm o cantitate mare de informații recente (evidentă în bibliografie), într-o formă sintetică și clară. Am procedat la o *revizie completă* a textului primei ediții (care într-un procent important a fost rescris) și mai ales la *actualizarea* lui. În prima parte, de genetică fundamentală (capitolele 1-8), am introdus datele recente despre genomul uman, precum și un capitol nou dedicat metodelor de analiză a structurii și funcției genelor; au fost actualizate în special: reglarea expresiei genice (în mod particular reglarea epigenetică și interferența ARN), replicarea ADN, variabilitatea genetică (mutațiile genice, anomaliile cromozomiale și polimorfismele ADN), precum și originea și evoluția

RUMANIAN OPEN LIBRARY

populațiilor umane. Partea a doua, de genetică medicală, începe cu un capitol despre bolile genetice și medicina genomică (inclusiv farmacogenomica și bolile genomice); urmează, firesc, capitole dedicate fiecărui grup de boli genetice, punându-se un accent deosebit pe actualizarea datelor privind genetica dezvoltării, genetica bolii canceroase, *screening*-ul și diagnosticul prenatal, precum și un domeniu nou privind abordările genetice în tratamentul bolilor umane. Ca și în prima ediție, ultimul capitol este dedicat problemelor și dilemelor etice în genetica medicală, inclusiv în medicina genomică.

Ediția a doua a *Geneticii medicale* își păstrează larga adresabilitate a problemelor pentru medicii din diferite specialități, pentru rezidenți și studenți. În contextul integrării medicinei genomice în practica medicală, această carte devine, în opinia noastră, un instrument esențial pentru a dobândi cunoștințe, vocabular și mai ales un concept larg despre rolul genomicii în medicină, pentru a înțelege mai bine medicina viitorului apropiat.

Mulțumiri

Autorii principali mulțumesc călduros celor 26 de colaboratori din țară și străinătate pentru contribuția lor prețioasă la redactarea unor subiecte. O mențiune specială pentru prof. dr. Marius Bembea și dr. Cornel Popovici care au revizuit, pe baza expertizei lor profesionale deosebite, mai multe capitole ale cărții, constituind pentru noi un feedback prețios. Alese mulțumiri Domnului profesor dr. Gheorghe Benga, membru al Academiei Române, și Doamnei profesor Paula Grigorescu-Sido, membru de onoare al ASMR, care au avizat favorabil conținutul științific al cărții noastre.

Mulțumim în mod deosebit Editurii Polirom pentru înțelegerea, sprijinul și profesionalismul pe care ni l-a acordat. Mulțumim pentru acordarea dreptului de copyright al unor figuri folosite la ambele ediții, editurilor: BIOS Scientific Publisher/Garland Science, Oxford; Churchil Livingstone, Edinburgh; Elsevier, New York; Flammarion, Paris; Freeman Co, New York; Mosby, St. Louis; W.B. Saunders Co, Phildelphia; Willey-Liss, New York.

Nu în ultimul rând, adresăm alese mulțumiri familiilor noastre, pentru încurajarea continuă, înțelegerea și răbdarea acordată în lunga perioadă de redactare a cărții.

Iași, mai 2011

Mircea Covic
Dragoș T. Ștefănescu
Ionel Sandovici

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PREFAȚĂ
la ediția I

Cunoașterea aprofundată a mecanismelor genetice este decisivă atât pentru înțelegerea multiplelor aspecte ale etiopatogeniei bolilor ereditare și multifactoriale, cât și pentru interpretarea corectă a variatelor trăsături fenotipice și forme clinice ale acestor afecțiuni care, prin numărul și severitatea lor, se constituie nu numai într-unul dintre capitolele cele mai redutabile ale patologiei umane, ci și într-o problemă majoră de sănătate publică.

În ultimii 20 de ani, științele biomedicale s-au aflat sub dominația exploziei informaționale produse de inimaginabila dezvoltare a tehnologiilor geneticii moleculare, care au produs o veritabilă revoluție, comparabilă ca importanță cu descoperirea microscopului. Aplicarea acestor tehnologii a culminat cu finalizarea – în 2001 – a celui mai îndrăzneț și ambițios program de investigare a biologiei umane, *Proiectul Genom Uman*. Prin descifrarea completă a conținutului informațional al genomului uman s-au creat premisele elaborării unor metodologii obiective și înalt informative de diagnostic – inclusiv de diagnostic prenatal și presimptomatic – al bolilor genetice, precum și a unor noi strategii terapeutice.

Impactul geneticii în practica medicală, sănătatea publică și cercetarea medicală a devenit important și unanim recunoscut. Asistăm la un proces extrem de dinamic de „genetizare a medicinei" și la emergența unui nou concept – cel de *medicină moleculară sau genomică*. Volumul informațiilor referitoare la aspectele moleculare ale patologiei umane se află într-un proces de creștere exponențială. Rata descoperirilor depășește, de multe ori, capacitatea comunității medicale de a și le însuși și aplica în vederea sporirii calității actului medical. Devine astfel necesară asigurarea unor modalități de „educație genetică", accesibile atât studenților la medicină, cât și rezidenților, medicilor de familie și celor aparținând altor specialități, dornici să dobândească sau să-și actualizeze cunoștințele de genetică medicală. Conștienți de necesitatea stringentă a perfecționării pregătirii profesionale, ne-am propus să realizăm o lucrare care să prezinte într-o manieră comprehensivă și precisă principiile geneticii umane, rolul factorilor genetici în menținerea stării de sănătate și în apariția bolilor, mecanismele moleculare implicate în patologia umană. În intenția noastră, lucrarea ar trebui să doteze studenții, rezidenții și medicii de diferite specialități cu cunoștințe referitoare la progresele recente din domeniul geneticii și la modul de aplicare a acestora în îngrijirea bolnavilor.

Ne-am propus ca prezentarea elementelor de genetică medicală să fie completă și actualizată la nivelul anului 2003 (fapt ce explică și dimensiunile cărții), dar nu exhaustivă; de aceea, cartea noastră nu se dorește a fi un tratat de genetică umană și nici un compendiu de boli genetice, ci o bază solidă de referință pentru o *educație medicală continuă*. Am urmărit în primul rând transmiterea unor *cunoștințe* fundamentale, dezvoltarea unor *aptitudini* pentru practica medicinei genetice și formarea unor *atitudini* bazate pe respect și compasiune pentru bolnavul cu afecțiuni genetice, sprijinind totodată moral și profesional familia acestuia.

Suntem conștienți că, datorită ritmului alert al acumulării informațiilor în domeniul geneticii medicale, unele dintre aspectele prezentate în această lucrare se vor modifica la scurt timp după apariția ei. Sperăm însă că interesul pe care îl va suscita, criticile și eventualele aprecieri pozitive vor constitui un punct de sprijin pentru eforturile ulterioare de actualizare a conținutului și modalităților de prezentare.

În final, dorim să aducem un omagiu, prețuirea și recunoștința noastră, *Profesorului Alexandru Caratzali, Academicianului Ioan Moraru și Profesorului Constantin Maximilian, fondatorii geneticii medicale în România*. Ne exprimăm speranța că, prin lucrarea de față, continuăm eforturile lor de a dezvolta acest domeniu modern și important pentru medicina românească.

BCU "CAROL DAVILA" MEDICINE LIBRARY

Mulţumiri

Autorii principali mulţumesc călduros celor 19 colaboratori, din 7 centre universitare (menţionaţi în lista realizatorilor), pentru sprijinul lor preţios în redactarea unor subiecte. De asemenea, apreciază implicarea rezidenţilor de Genetică medicală din Iaşi pentru culegerea informaţiilor de pe Internet. Mulţumim studenţilor cu care am interacţionat în ultimele două decenii, „experimentând" anumite modele de prezentare; cu siguranţă că şi noi am învăţat de la ei cel puţin la fel de mult cât au învăţat ei de la noi. De un real folos ne-au fost discuţiile „lingvistice" şi opiniile prof. dr. Valeriu Rusu, autorul apreciatului *Dicţionar medical*. Mulţumim călduros Editurii Polirom pentru profesionalismul şi sprijinul pe care ni le-a acordat. Nu în ultimul rând, alese mulţumiri familiilor noastre, pentru încurajarea continuă, înţelegerea şi răbdarea manifestată pe parcursul „gestaţiei" acestei cărţi.

Alese mulţumiri celor trei personalităţi ale ştiinţei medicale româneşti – academicianul Nicolae Cajal, profesorul dr. Gheorghe Benga şi profesorul dr. Eugen Ciofu – care au avizat favorabil conţinutul cărţii noastre.

În final mulţumim pentru acordarea dreptului de copyright pentru unele figuri editurilor: BIOS Scientific Publishers, Oxford; Churchill Livingstone, Edinburgh; Elsevier, NewYork; Flammarion, Paris; Freeman Co, New York; Mosby, St. Louis; W.B.Saunders Co, Philadelphia; Willey-Liss, New-York.

Iaşi, decembrie 2003

Mircea Covic
Dragoş Ştefănescu
Ionel Sandovici

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lista autorilor

Profesor dr. Mircea Covic
Disciplina Genetică Medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr. T. Popa",
Iaşi

Profesor dr. Dragoş T. Ştefănescu
GENETIC-LAB,
Bucureşti

Dr. Ionel Sandovici
Research Associate,
Metabolic Research Laboratories,
Department of Obstetrics & Gynaecology and Centre for Trophoblast Research, University of Cambridge,
United Kingdom

Profesor dr. Vasile Astarastoae
Disciplina Medicină Legală, Deontologie Medicală şi Bioetică
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr. T. Popa",
Iaşi

Profesor dr. Valerica Belengeanu
Disciplina Genetică Medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Victor Babeş",
Timişoara

Profesor dr. Marius Bembea
Compartimentul Genetică Medicală
Spitalul Clinic Municipal „dr. Gavril Curteanu",
Oradea

Asistent universitar dr. Elena Emanuela Braha
Catedra de Genetică Medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr. T. Popa",
Iaşi

Asistent universitar dr. Lăcrămioara Butnariu
Disciplina Genetică Medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr. T. Popa",
Iaşi

Asistent universitar dr. Lavinia Caba
Disciplina Genetică Medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr. T. Popa",
Iaşi

Conferenţiar dr. Petre Cianga
Disciplina Imunologie
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr. T. Popa",
Iaşi

Conferenţiar dr. Cristina Gavrilovici
Disciplina Medicină Legală, Deontologie Medicală şi Bioetică
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr. T. Popa",
Iaşi

Conferenţiar dr. Eusebie Vlad Gorduza
Disciplina Genetică Medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr. T. Popa",
Iaşi

Şef lucrări dr. Cristina Gug
Disciplina Genetică Medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Victor Babeş",
Timişoara

Asistent universitar dr. Maria Claudia Jurca
Disciplina Genetică Medicală
Facultatea de Medicină şi Farmacie, Universitatea din Oradea,
Oradea

Asistent universitar dr. Mihai Macovei
Disciplina Genetică Medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr. T. Popa",
Iaşi

Şef lucrări dr. Mariela Militaru
Disciplina Genetică Medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Iuliu Haţieganu",
Cluj-Napoca

Profesor dr. Francisc Mixich
Disciplina Biologie Celulară şi Moleculară
Universitatea de Medicină şi Farmacie,
Craiova

Asistent universitar dr. Monica-Cristina Pânzaru
Disciplina Genetică Medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr. T. Popa",
Iaşi

Profesor dr. Ioan Victor Pop
Disciplina Genetică Medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Iuliu Haţieganu",
Cluj-Napoca

Dr. Cornel Popovici
Laboratoire de Génétique Chromosomique
Département de Génétique Médicale
Hôpital de la Timone – Enfants,
Marseille, France

Profesor dr. Maria Puiu
Disciplina Genetică Medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Victor Babeş",
Timişoara

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Conferențiar dr. Cristina Rusu
Disciplina Genetică Medicală
Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”,
Iași

Profesor dr. Emilia Severin
Disciplina Genetică Medicină Dentară
Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”,
București

Dr. Adriana Sireteanu
Disciplina Genetică Medicală
Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”,
Iași

Asistent universitar dr. Cristina Skrypnyk
Disciplina Genetică Medicală
Facultatea de Medicină și Farmacie, Universitatea din Oradea,
Oradea

Dr. Horia C. Stănescu
Institute of Child Health
University College London,
London, United Kingdom

Conferențiar dr. Dorina Stoicănescu
Disciplina Genetică Medicală
Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”,
Timișoara

Conferențiar dr. Roxana-Georgiana Tauşer
Facultatea de Farmacie
Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”,
Iași

Dr. Mihai Voloșciuc
Centrul de Genetică Medicală
Spitalul de copii „Sfânta Maria”,
Iași

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

Cuvânt înainte (academician Mircea Maliţa) V
Cuvânt înainte la ediţia I (academician Nicolae Cajal) VII
Prefaţă IX
Prefaţă la ediţia I XI
Lista autorilor XIII

CAPITOLUL 1 – GENETICA UMANĂ ŞI IMPORTANŢA EI ÎN MEDICINA MODERNĂ

Mircea Covic, Dragoş Ştefănescu

A. Conţinutul geneticii umane 1
1. Genetica – ştiinţa eredităţii şi variabilităţii 1
1.1. Ereditatea 1
1.2. Variabilitatea 1
2. Genetica umană – disciplină fundamentală, clinică şi medico-socială 2
B. Omul, ereditatea şi mediul 3
1. Individualitatea genetică şi biologică 3
1.1. Individualitatea genetică 3
1.2. Individualitatea biologică 3
1.3. Importanţa conceptului de individualitate genetică şi biologică 4
2. Determinismul caracterelor fenotipice 4
2.1. Caracterele fenotipice pur ereditare 5
2.2. Caractere determinate de interacţiunea ereditate-mediu 6
2.3. Caractere fenotipice determinate de mediu 6
3. Relaţia genotip → fenotip ← mediu 8
3.1. Relaţia genotip → fenotip 8
3.2. Relaţia mediu → fenotip 9
3.3. Relaţia mediu → genotip 9
3.4. Relaţia genotip → fenotip → mediu la nivel molecular 9
4. Omul – subiect de studiu al geneticii umane 9
C. Istoria geneticii umane 10
1. Etapa preştiinţifică (→ 1865) 10
2. Etapa fundamentării geneticii ca ştiinţă şi a introducerii sale în medicină (1865→ 1960) 10
3. Dezvoltarea geneticii medicale (1960 → 1980) 11
4. Dezvoltarea geneticii şi a medicinei moleculare (1980 → 2003) 11
5. Era genomicii şi medicina genomică (2003 →) 13
D. Importanţa geneticii în medicina modernă 14
1. Bolile genetice şi impactul lor clinic şi social 14
2. Implicaţiile geneticii medicale în practica clinică 15
3. Abordarea genetică devine o componentă de rutină în relaţia medic – pacient 17
4. Perspectivele medicinei genomice 19
Bibliografie specifică selectivă 22

CAPITOLUL 2 – STRUCTURA ŞI ORGANIZAREA CELULARĂ A ADN

Mircea Covic, Vlad Gorduza, Cornel Popovici

A. ADN este substratul molecular al eredităţii 23
1. Evoluţia concepţiilor despre natura genei 23
2. Demonstrarea rolului genetic al ADN 23
B. Structura ADN 25
1. Structura primară şi secundară a ADN 25
1.1. Structura primară a ADN 25
1.2. Structura secundară a ADN 26
1.3. Relaţiile dintre structura şi funcţiile ADN 28
2. Structuri alternative ale ADN 30
C. Organizarea ADN în celulă 31

BUASVM PALAS UNIVERSITY LIBRARY

1. Aparatul genetic 31
2. Cromatina 32
2.1. Eucromatina şi heterocromatina 32
2.2. Cromatina sexuală 33
2.3. Structura supramoleculară a cromatinei 34
3. Cromozomii umani 38
3.1. Morfologia cromozomilor umani 38
3.2. Analiza cromozomilor 42
3.3. Clasificarea şi nomenclatura cromozomilor umani 53
3.4. Heteromorfismul cromozomilor 55
Bibliografie specifică selectivă 56

CAPITOLUL 3 – STRUCTURA GENELOR ŞI A GENOMULUI UMAN

Mircea Coviç, Dragoş Ştefănescu, Ionel Sandovici, Horia Stănescu

A. Concepţia clasică despre structura genei 57
1. Gena – unitate de structură a materialului genetic 57
2. Fenomenele de înlănţuire genică (*linkage*) şi încrucişare cromozomială (*crossing-over*) 59
2.1. Înlănţuirea genică (*linkage*) 60
2.2. Încrucişarea cromozomială (*crossing-over*) şi recombinarea genică omoloagă 60
2.3. Dezechilibrul de înlănţuire şi asocierile genetice 62
2.4. Importanţa teoretică şi practică a fenomenelor de înlănţuire şi recombinare genică 65
B. Concepţia actuală despre structura genei 67
1. Anatomia unei gene care codifică o proteină 67
1.1. Regiunea centrală (cadrul deschis de lectură) a genei 67
1.2. Regiunile de reglare a genei 69
2. Gene comune şi gene specifice 71
3. Gene unice şi familii de gene 71
3.1. Gene unice sau cvasiunice. Pseudogene 71
3.2. Familii şi superfamilii de gene 72
4. Elementele genetice mobile 74
C. Structura genomului uman 75
1. Date generale despre genomul uman (cunoscute înainte de iniţierea PGU, 1990 75
1.1. Mărimea genomului uman 75
1.2. Fragmentarea genomului uman 75
1.3. Heterogenitatea secvenţelor nucleotidice ale ADN 76
1.4. ADN genic şi extragenic 77
2. Proiectul genom uman 78
2.1. Schiţa genomului uman (2001) 78
2.2. Versiunea finisată a genomului uman (IHGSC, 2004) 79
2.3. Etapele ulterioare în studiul genomului uman 80
3. Structura genomului uman (după finalizarea PGU) 82
3.1. Date generale 82
3.2. Genele ce codifică proteine şi secvenţele înrudite 83
3.3. ADN necodant 86
3.4. Actualizarea definiţiei genei 91
4. Genomul mitocondrial 93
5. Variabilitatea structurală a genomului uman 95
Bibliografie specifică selectivă 96

CAPITOLUL 4 – EXPRESIA INFORMAŢIEI EREDITARE (FUNCŢIA GENEI)

Mircea Covic, Ionel Sandovici, Elena Braha

A. Concepţia clasică despre funcţia genei 97
1. Gena – unitate de funcţie şi mutaţie 97
2. Poligenia 98
3. Pleiotropia 99
4. Interacţiunile genei 100
4.1. Interacţiunile genei 100

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4.2. Interacţiunile nealelice
4.3. Interacţiunile genelor cu mediul ... 101
5. Heterogenitatea genetică ... 102
B. Concepţia actuală despre funcţia genei ... 103
1. Genele controlează sinteza proteinelor ... 104
2. Structura proteinelor ... 104
3. Genele structurale determină secvenţa aminoacizilor în proteină ... 105
4. Relaţia „o genă → un polipeptid" este mult mai complexă ... 107
5. Interacţiunile genice în concepţia actuală ... 109
C. Mecanismele moleculare ale expresiei genice ... 109
1. Transcripţia ... 111
1.1. Date generale ... 111
1.2. Formarea ARNm precursor ... 111
1.3. Maturarea ARNm precursor ... 113
1.4. Controlul calităţii ARNm ... 114
2. Translaţia ... 115
2.1. Codul genetic ... 116
2.2. Aparatul de translaţie ... 116
2.3. Procesul de translaţie ... 118
3. Dirijarea proteinelor nou-sintetizate spre locul de destinaţie ... 119
4. Modificările proteinelor după sinteză ... 121
5. Sinteza proteinelor, originea şi evoluţia vieţii ... 122
D. Reglarea expresiei genelor ... 122
1. Reglarea pre-transcripţională a expresiei genice ... 124
1.1. Modificări în conformaţia ADN ... 125
1.2. Mecanismele epigenetice ... 125
1.3. Implicaţii ale mecanismelor epigenetice în controlul expresiei genei ... 125
1.4. Rolul modificărilor epigenetice în etiopatogenia bolilor umane ... 130
2. Reglarea transcripţională ... 132
2.1. Elementele cis-reglatoare ... 133
2.2. Factorii de transcripţie trans-reglatori ... 133
2.3. Controlul la distanţă al expresiei genice ... 135
2.4. Reglarea transcripţiei ca răspuns la semnalele extracelulare ... 136
2.5. Selectarea promotorilor ... 137
3. Reglarea post-transcripţională ... 138
3.1. Matisarea alternativă sau diferenţială ... 140
3.2. Poliadenilarea alternativă ... 140
3.3. Modificarea structurii primare a ARNm („RNA editing") ... 141
3.4. Modificarea stabilităţii (duratei de viaţă) sau stocajului ARNm ... 141
4. Reglarea translaţională ... 141
4.1. Reglarea translaţională prin fenomenul de interferenţă a ARN (rolul ARNmi) ... 142
4.2. Reglarea translaţională prin degradarea moleculelor de ARNm cu mutaţii nonsens ... 142
4.3. Reglarea translaţională ca răspuns la acţiune unor factori externi ... 143
4.4. Localizarea intracelulară a ARNm ... 143
Bibliografie specifică selectivă ... 144
... 144

CAPITOLUL 5 – ANALIZA STRUCTURII ŞI FUNCŢIEI GENELOR

Ionel Sandovici, Mircea Covic, Horia Stănescu

A. Clonarea ADN ...
1. Clonarea ADN în celule ... 145
1.1. Obţinerea unor gene/fragmente de ADN ... 146
1.2. Construcţia moleculelor de ADN recombinant ... 146
1.3. Transformarea ... 148
1.4. Amplificarea ... 151
1.5. Izolarea clonelor de ADN recombinant ... 151
1.6. Construcţia băncilor sau bibliotecilor de gene ... 151
1.7. Sisteme de clonare pentru expresia genică ... 151
2. Clonarea acelulară a ADN (tehnica PCR) ... 152
B. Detecţia şi analiza acizilor nucleici ... 152
... 155

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. Hibridizarea moleculară a acizilor nucleici 155
2. Metode de hibridizare cu ţinta imobilizată 157
2.1. Analiza ADN genomic prin metoda de transfer Southern 157
2.2. Analiza ARNm prin Northern blot 158
2.3. Analiza cu sonde oligonucleotidice specifice unei alele (ASO) 158
2.4. Hibridizarea *in situ* a cromozomilor 159
2.5. Identificarea ADN al organismelor exogene 160
3. Metode de hibridizare a acizilor nucleici pe microreţele (hibridizarea inversă) 160
4. Secvenţierea ADN 161
4.1. Metoda de sinteză enzimatică (Sanger) 162
4.2. Secvenţierea prin terminatori ddNTP marcaţi fluorescent 162
4.3. Pirosecvenţierea iterativă 163
4.4. Secvenţierea masivă paralelă 163
C. Analiza expresiei genelor 165
1. Analiza expresiei genelor la nivel de ARN 165
2. Analiza expresiei genelor la nivel de proteine 166
3. Analiza partenerilor moleculari ai produşilor codificaţi de gene 167
D. Studierea funcţiei genelor prin manipulare genetică 169
1. Principalele metode de manipulare genică 170
2. Manipularea genică *in vivo* 170
3. Tehnologii bazate pe interferenţa ARN 173
E. Cartografierea şi identificarea genelor pe cromozomii umani 174
1. Cartografierea genomului uman 174
1.1. Cartografierea genetică 175
1.2. Cartografierea fizică 175
1.3. Aplicaţiile cartografierii genomului uman 176
2. Identificarea genelor ce produc boli umane 176
2.1. Identificarea genelor morbide prin clonare poziţională 177
2.2. Identificarea genelor morbide fără informaţii poziţionale (clonarea funcţională) 177
2.3. Confirmarea genei candidat 177
Bibliografie specifică selectivă 178

CAPITOLUL 6 – TRANSMITEREA INFORMAŢIEI EREDITARE

Marius Bembea, Mircea Covic, Victor Pop, Mihai Voloşciuc

A. Replicarea ADN 179
1. Mecanismul molecular al replicării ADN 180
1.1. Aparatul de replicare 180
1.2. Iniţierea replicării 181
1.3. Procesul de replicare 181
2. Replicarea telomerelor 183
3. Replicarea ADN şi structura cromatinei 184
4. Fidelitatea replicării ADN 186
B. Transmiterea informaţiei genetice de la o celulă la celulele „fiice" 187
1. Ciclul celular 187
1.1. Fazele ciclului celular mitotic 188
1.2. Evoluţia celulelor rezultate prin diviziune 190
1.3. Controlul ciclului celular 190
2. Mitoza 193
2.1. Fazele mitozei 193
2.2. Erori de distribuţie a materialului genetic în mitoză 195
C. Transmiterea informaţiei genetice de la părinţi la descendenţi 196
1. Gametogeneza 196
1.1. Caracterele generale ale meiozei 196
1.2. Particularităţile gametogenezei la bărbat şi la femeie 199
1.3. Erorile de recombinare şi distribuţie a materialului genetic în meioză şi consecinţele lor 201
2. Fecundarea 203
D. Ereditatea monogenică 204
1. Legile lui Mendel 204
1.1. Prima lege a lui Mendel: legea segregării 205

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.2. A doua lege a lui Mendel: legea asortării independente 206
2. Transmiterea caracterelor monogenice 208
2.1. Date generale 208
2.2. Transmiterea autozomal dominantă 211
2.3. Transmiterea autozomal recesivă 216
2.4. Transmiterea legată de sex 220
2.5. Transmiterea legată de X recesivă 222
2.6. Transmiterea legată de X dominată (XD) 224
3. Ereditatea monogenică non-mendeliană 224
3.1. Mutațiile instabile sau dinamice 225
3.2. Disomia uniparentală 225
3.3. Amprentarea parentală (genomică) 226
3.4. Mozaicismul 227
3.5. Transmiterea pe linie maternă 228
4. Ereditatea oligogenică 228
E. Ereditatea poligenică (multifactorială) 230
1. Stabilirea naturii genetice a unui caracter familial non-mendelian 230
1.1. Măsurarea agregării familiale 230
1.2. Studiul gemenilor 231
1.3. Studiile de adopție 232
1.3. Heritabilitatea 232
2. Teoriile care explică determinismul genetic al caracterelor multifactoriale 233
2.1. Distribuția continuă (normală sau gaussiană) a caracterelor poligenice cantitative 233
2.2. Distribuția continuă cu prag a caracterelor poligenice calitative 235
2.3. Modelul mixt, oligogenic, al bolilor multifactoriale 237
3. Identificarea genelor implicate în bolile multifactoriale 238
Bibliografie specifică selectivă 239

CAPITOLUL 7 – VARIABILITATEA GENETICĂ

Cornel Popovici, Mircea Covic, Vlad Gorduza, Ionel Sandovici, Maria Puiu

A. Sursele de variabilitate 241
1. Mutațiile 241
2. Recombinările genetice 242
2.1. Recombinarea genomică 242
2.2. Recombinarea cromozomială 243
2.3. Recombinarea intra-genică 244
3. Migrațiile 244
B. Mutațiile genice 244
1. Tipuri și mecanisme de producere a mutațiilor genice 244
1.1. Substituția unui nucleotid 246
1.2. Deleții și inserții mici 248
1.3. Remanieri genice aberante 250
1.4. Mutații dinamice și expansiunea repetițiilor trinucleotidice 253
1.5. Mecanisme rare 256
2. Consecințele genotipice și fenotipice ale mutațiilor genice 256
2.1. Mutații în genomul nuclear și mitocondrial 256
2.2. Consecințele mutațiilor asupra informației și expresiei genice 256
2.3. Efectul fenotipic al mutațiilor patogene 257
2.4. Corelații între genotip și fenotip 258
3. Cauzele și frecvența mutațiilor genice 259
3.1. Mutații spontane 259
3.2. Mutații induse 260
3.3. Frecvența mutațiilor genice 260
4. Mecanismele reparării leziunilor ADN 262
4.1. Mecanismele de reparare ale ADN nuclear 262
4.2. Repararea leziunilor la nivelul ADN mitocondrial 266
4.3. Tolerarea leziunilor ADN 266
C. Anomaliile cromozomiale 266
1. Tipurile și mecanismele de producere a anomaliilor cromozomiale 267

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.1. Clasificarea anomaliilor cromozomiale 268
1.2. Anomaliile cromozomiale numerice 268
1.3. Anomaliile cromozomiale structurale 269
1.4. Disomiile uniparentale 277
1.5. Anomaliile cromozomiale dobândite 278
2. Consecințele fenotipice ale anomaliilor cromozomiale 279
2.1. Consecințele anomaliilor cromozomiale neechilibrate 279
2.2. Consecințele anomaliilor cromozomiale echilibrate 280
3. Frecvența și cauzele anomaliilor cromozomiale 280
3.1. Frecvența anomaliilor cromozomiale 280
3.2. Cauzele și mecanismele de producere ale aneuploidiilor 282
3.3. Cauzele anomaliilor cromozomiale de structură 284
D. Polimorfismele genetice 285
1. Polimorfismele proteice 285
1.1. Polimorfismul sistemului de grup AB0 286
1.2. Polimorfismul sistemului de grup sangvin Rh 286
1.3. Polimorfismul alfa$_1$-antitripsinei 287
2. Polimorfisme ADN 287
2.1. Polimorfismele unui singur nucleotid (SNPs) 289
2.2. Polimorfismele fragmentelor mai mici de 1.000 de perechi de baze 291
2.3. Polimorfismele submicroscopice 292
2.4. Polimorfismele microscopice 293
2.5. Aplicațiile practice ale polimorfismelor ADN 294
Bibliografie specifică selectivă 295

CAPITOLUL 8 – GENETICA POPULAȚIILOR

Emilia Severin, Dragoș Ștefănescu, Mircea Covic, Maria Puiu

A. Frecvența genelor și genotipurilor într-o populație 297
1. Definiția și obiectivele geneticii populațiilor 297
2. Echilibrul genetic. Legea Hardy-Weinberg 298
3. Aplicațiile medicale ale legii Hardy-Weinberg 300
3.1. Obținerea unor date despre frecvența genică utile pentru realizarea sfatului genetic 300
3.2. Evaluarea rentabilității unor programe de depistare a unor boli genetice 301
B. Factorii care influențează frecvența genică și genotipică 301
1. Uniunile (împerecherile) neîntâmplătoare 301
2. Mutațiile 302
3. Selecția 303
4. Migrațiile și fluxul genic 304
5. Populațiile reduse 305
6. Efectele acțiunilor disgenice și eugenice asupra frecvențelor genice 306
C. Originea și evoluția populațiilor umane 307
1. Evoluția omului. Dovezile paleoantropologiei 308
1.1. Apariția speciei umane 308
1.2. Primii oameni arhaici 309
1.3. Apariția omului anatomic modern 311
1.4. Originea africană recentă a oamenilor moderni 311
2. Dovezile genetice ale evoluției 312
2.1. Studiul genetic al primatelor 312
2.2. Studiul genetic al fosilelor omului modern (paleogenomica) 314
2.3. Studiul polimorfismelor ADN la populațiile umane actuale 314
2.4. Migrațiile primilor oameni moderni „out of Africa" 315
2.5. Co-evoluția gene ↔ cultură 316
3. „Rasele" umane 316
Bibliografie specifică selectivă 318

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 9 – BOLILE GENETICE ŞI MEDICINA GENOMICĂ

Mircea Covic, Georgiana Tauşer, Cristina Scrypnick, Ionel Sandovici

A. Interacţiunea dintre ereditate şi mediu în producerea bolilor 319
1. Starea de sănătate şi cea de boală 319
2. Concepţiile despre boală 319
3. Clasificarea (taxonomia) genetică şi genomică a bolilor 320
B. Ecogenetica şi farmacogenetica 321
1. Ecogenetica 322
1.1. Ecogenetica infecţiilor 322
1.2. Ecogenetica nutriţională 322
1.3. Ecogenetica chimică 324
1.4. Ecogenetica fizică 326
2. Farmacogenetica şi farmacogenomica 327
2.1. Farmacogenetica şi variabilitatea farmacocinetică 328
2.2. Farmacogenetica şi variabilitatea farmacodinamică 328
2.3. Farmacogenomica 330
C. Bolile genetice 331
1. Clasificarea bolilor genetice 333
1.1. Bolile cromozomiale 333
1.2. Bolile monogenice 333
1.3. Bolile mitocondriale 333
1.4. Bolile multifactoriale 334
1.5. Bolile prin mutaţii somatice 334
2. Bolile genomice 334
3. Caracterele generale ale bolilor genetice 335
4. Impactul şi consecinţele bolilor genetice asupra stării de sănătate 337
D. Medicina genomică 338
1. Medicina personalizată 340
2. Medicina predictivă 340
3. Domenii de aplicaţie a medicinei genomice 341
4. Integrarea medicinei genomice în practica medicală 342
Bibliografie specifică selectivă 342

CAPITOLUL 10 – CONSULTUL ŞI SFATUL GENETIC

Mircea Covic, Marius Bembea, Cornel Popovici, Vlad Gorduza

A. Consultul genetic 345
1. Definiţie. Obiective 345
2. Cadrul organizatoric 345
3. Indicaţiile consultului genetic 345
4. Principiile de bază ale consultului genetic 346
5. Etapele consultului genetic 346
5.1. Contactul iniţial cu bolnavul 348
5.2. Anamneza personală şi familială 348
5.3. Examenul fizic 348
5.4. Alte examene clinice şi explorări paraclinice 353
5.5. Analiza şi interpretarea datelor 354
5.6. Explorări (teste) genetice 354
5.7. Finalizarea consultului genetic 357
5.8. Comunicarea concluziilor 357
5.9. Urmărirea evoluţiei pacienţilor 358
5.10. Contactarea rudelor cu risc genetic crescut 359
B. Explorările genetice 360
1. Diagnosticul cromozomial 360
1.1. Indicaţiile testului cromatinei sexuale 360
1.2. Indicaţiile tehnicilor de citogenetică convenţională 361
1.3. Indicaţiile tehnicilor de citogenetică moleculară 361
1.4. Indicaţiile analizei cromozomiale cu microreţele ADN (cariotipul molecular) 362

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.5. Indicațiile analizei cromozomiale în bolile dobândite prin mutații somatice 363
2. Diagnosticul molecular 364
2.1. Definiție. Obiective 364
2.2. Metode directe de diagnostic molecular 365
2.3. Metode indirecte de diagnostic molecular 367
2.4. Metode ce asociază microrețelele de ADN și secvențierea 367
C. Sfatul genetic 368
1. Definiție. Obiective. Circumstanțe de acordare 368
2. Principii și metodologie 368
2.1. Principii generale de acordare a sfatului genetic 369
2.2. Probleme ce vor fi puse în discuție 369
3. Riscul genetic în bolile cromozomiale 371
3.1. Sfatul genetic în anomaliile cromozomiale numerice 371
3.2. Sfatul genetic în anomaliile cromozomiale structurale echilibrate 371
4. Riscul genetic în bolile monogenice 372
4.1. Sfatul genetic în bolile autozomal dominante 373
4.2. Sfatul genetic în bolile autozomal recesive 375
4.3. Sfatul genetic în bolile legate de X recesive 376
5. Riscul genetic în bolile multifactoriale 377
D. Serviciile de genetică clinică 379
1. Definiție 379
2. Obiective 379
3. Organizare 379
4. Funcții 380
5. Principii etice 381
Bibliografie specifică selectivă 381

CAPITOLUL 11 – BOLILE CROMOZOMIALE

Vlad Gorduza, Cornel Popovici, Cristina Scrypnick, Mircea Covic, Viorica Belengenau, Dorina Stoicănescu, Monica Pânzaru, Lăcrămioara Butnariu

A. Boli cromozomiale autozomale 384
1. Sindroame produse de trisomiile autozomale 384
1.1. Sindromul Down 384
1.2. Sindromul Edwards 390
1.3. Sindromul Patau 391
2. Sindroamele cu deleții autozomale 392
2.1. Sindromul „*cri du chat*" 392
2.2. Sindromul Wolf-Hirschhorn 393
3. Sindroame cu microdeleții și microduplicații cromozomiale 394
3.1. Sindromul velo-cardio-facial 396
3.2. Sindromul Prader-Willi 399
3.3. Sindromul Williams-Beuren 402
B. Boli cromozomiale gonozomale 404
1. Sindromul Turner 404
2. Sindromul Klinefelter 407
3. Trisomia X și alte polisomii X 409
4. Sindromul 47, XXY 410
C. Tulburările de reproducere de cauză cromozomială 410
1. Sterilitatea feminină 410
2. Sterilitatea masculină 410
3. Avorturi spontane și nou-născuții morți 413
Bibliografie specifică selectivă 415

CAPITOLUL 12 – BOLILE MONOGENICE

Ionel Sandovici, Dragoș Ștefănescu, Victor Pop, Mircea Covic, Cristina Rusu, Mariela Militaru

A. Bazele moleculare și biochimice ale bolilor monogenice 417
1. Mutații cu pierderea funcției 418

BCU CLUJ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Mutații cu câștig de funcție
B. Boli moleculare ... 420
1. Boli enzimatice (erori înnăscute de metabolism) ... 420
1.1. Galactozemia ... 421
1.2. Fenilcetonuria ... 422
1.3. Bolile lizozomale ... 424
1.4. Bolile perxizomale ... 426
2. Boli produse prin anomalii ale proteinelor de transport ... 427
2.1. Fibroza chistică ... 427
3. Boli prin anomalii ale proteinelor structurale ... 430
3.1. Distrofia musculară Duchenne ... 432
3.2. Osteogeneza imperfectă ... 433
3.3. Sferocitoza ereditară ... 436
3.4. Sindromul Ehlers-Danlos ... 437
4. Boli prin anomalii ale proteinelor implicate în comunicarea intercelulară și controlul dezvoltării ... 437
4.1. Hipercolesterolemia familială ... 438
4.2. Boala polichistică renală autozomal dominantă ... 441
5. Boli ale proteinelor implicate în controlul homeostaziei extracelulare ... 442
5.1. Hemofilia A ... 443
D. Boli genetice produse prin expansiunea repetițiilor trinucleotidice ... 443
1. Caractere generale ... 446
2. Boală Huntington ... 446
3. Distrofia miotonică ... 449
Bibliografie specifică selectivă ... 450
... 452

CAPITOLUL 13 – BOLILE MITOCONDRIALE

Dragoș Ștefănescu, Mircea Covic

A. Structura moleculară, biogeneza și funcțiile mitocondriilor ... 453
1. Genomul mitocondrial ... 453
1.1. Particularitățile ADN mitocondrial ... 453
1.2. Homoplasmia, hetroplasmia și segregarea replicativă ... 453
2. Biogeneza și funcțiile mitocondriilor ... 454
3. Dinamica mitocondrială ... 454
4. Mutațiile ADNmt ... 456
5. Transmiterea la descendenți a mutațiilor ADNmt. ... 457
B. Principalele tipuri de boli mitocondriale ... 458
1. Manifestările clinice ale afecțiunilor mitocondriale ... 458
C. Alte consecințe ale mutațiilor ADNmt ... 458
1. Mutațiile ADNmt și senescența ... 465
2. Mutațiile ADNmt în bolile neurodegenerative ... 465
3. Mutațiile ADNmt și tumorigeneza ... 466
4. Leziunile mitocondriale induse de medicamente ... 467
D. Sfatul genetic și tratamentul bolilor mitocondriale ... 468
1. Sfatul genetic în citopatiile mitocondriale ... 468
2. Tratamentul bolilor mitocondriale ... 468
Bibliografie specifică selectivă ... 469
... 469

CAPITOLUL 14 – BOLILE MULTIFACTORIALE

Marius Bembea, Mircea Covic, Mihai Macovei, Claudia Jurca

A. Identificarea genelor implicate în bolile multifactoriale ... 471
1. Etapele de identificare a genelor de susceptibilitate ... 472
2. Studiile de asociere utilizând întregul genom (GWAS) ... 473
B. Bolile comune ale adultului ... 475
1. Boala coronariană ... 475
2. Hipertensiunea arterială ... 477
3. Diabetul zaharat ... 480
4. Astmul bronșic ... 483

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

5. Bolile neurodegenerative: boala Alzheimer şi boala Parkinson 483
6. Psihozele 484
7. Cancerul 485
8. Obezitatea 486
9. Sindromul dependenţei de alcool 486
C. Malformaţiile congenitale izolate 487
1. Defectele de tub neural 488
2. Hidrocefalia 489
3. Malformaţiile congenitale de cord 490
4. Despicăturile labiale şi despicăturile palatine 490
5. Alte anomalii congenitale izolate 491
D. Autismul şi retardul mental 492
1. Autismul 492
2. Retardul mental 492
Bibliografie specifică selectivă 493

CAPITOLUL 15 – GENETICA DEZVOLTĂRII ŞI ANOMALIILE CONGENITALE

Ionel Sandovici, Mircea Covic, Monica Pânzaru, Lavinia Caba

A. Genetica dezvoltării 495
1. Categorii de gene implicate în controlul dezvoltării 495
1.1. Gene care codifică molecule de semnalizare paracrină şi receptorii acestora 496
1.2. Gene care codifică proteine ale matricei extracelulare 496
1.3. Gene care codifică factori de transcripţie 496
2. Procese majore în cadrul dezvoltării embrionare 498
2.1. Etapa embrionară precoce – dezvoltarea planului organismului 498
2.2. Etapa embrionară tardivă – organogeneza 504
3. Rolul apoptozei în dezvoltare 509
3.1. Controlul genetic şi desfăşurarea apoptozei 511
3.2. Reglarea apoptozei 512
3.3. Apoptoza şi patologia umană 512
4. Senescenţa 512
4.1. Senescenţa celulară 513
4.2. Genele longevităţii 514
B. Anomaliile congenitale 515
1. Clasificarea anomaliilor congenitale 516
1.1. Clasificarea patogenică 516
1.2. Clasificarea clinică 517
1.3. Clasificarea anomaliilor congenitale după gravitate 518
2. Cauzele anomaliilor congenitale 518
2.1. Cauzele negenetice 519
2.2. Cauzele genetice 521
3. Conduita practică în diagnosticul anomaliilor congenitale 522
4. Profilaxia anomaliilor congenitale 523
C. Sexualizarea normală şi patologică 523
1. Embriologia aparatului genital 524
1.1. Determinismul sexual: formarea gonadelor 524
1.2. Diferenţierea sexuală 527
2. Controlul genetic şi hormonal al sexualizării 527
2.1. Reglarea genetică a dezvoltării gonadelor 527
2.2. Controlul diferenţierii sexuale 530
3. Tulburări ale dezvoltării sexuale 531
3.1. Anomaliile cromozomilor sexuali 531
3.2. Anomalii ale formării sexului gonadic 532
3.3. Anomalii ale diferenţierii sexuale 532
4. Conduita practică în tulburările de sexualizare 536
Bibliografie specifică selectivă 537

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 16 – RETARDUL MENTAL

Cristina Rusu, Mircea Covic, Adriana Sireteanu

A. Date generale: definiție, clasificare, prevalență 539
B. Etiologia retardului mental 541
1. Cauzele genetice, epigenetice și de mediu ale retardului mental 541
2. Retardul mental legat de X (RMLX) 544
2.1. RMLX – prevalență, forme clinice, gene 544
2.2. Sindromul X fragil (FXS) 544
C. Evaluarea diagnostică a retardului mental 550
D. Sfatul genetic în retardul mental 555
Bibliografie specifică selectivă 558

CAPITOLUL 17 – GENETICA SISTEMULUI IMUN

Petre Cianga, Mircea Covic

A. Generalități despre sistemul imun 561
B. Mecanismele genetice care stau la baza generării diversității imunoglobulinelor 563
1. Formarea lanțurilor ușoare 564
2. Formarea lanțurilor grele 566
3. Mecanismul rearanjărilor genelor care codifică regiunea variabilă 567
4. Factori care contribuie la generarea diversității imunoglobulinelor 568
5. Asocierea genei constante și comutarea de clasă 569
C. Mecanismele genetice care stau la baza generării diversității TCR 571
D. Complexul major de histocompatibilitate 574
1. Genele MHC 574
2. Proprietățile și funcțiile sistemului HLA 577
3. Sistemul HLA și asocierea cu diverse afecțiuni 579
E. Imunodeficiențele 581
Bibliografie specifică selectivă 584

CAPITOLUL 18 – GENETICA BOLII CANCEROASE

Ionel Sandovici, Dragoș Ștefănescu, Mircea Covic

A. Clase de gene implicate în dezvoltarea cancerului 586
1. Oncogenele 586
2. Genele supresoare de tumori 590
3. Gene de stabilitate 591
4. Genele micro ARN 592
B. Anomalii citogenetice în cancer 593
1. Cauzele anomaliilor cromozomiale numerice 593
2. Anomalii structurale echilibrate 594
3. Anomaliile structurale neechilibrate 595
C. Evoluția multistadială a cancerelor 597
1. Imortalizarea celulelor tumorale 598
2. Modificări epigenetice în cancer 598
3. Mutații ale ADN mitocondrial în cancer 599
4. Angiogeneza tumorală 600
5. Rezistența în fața mecanismelor de moarte celulară programată 601
6. Inflamația tumorală 602
7. Reprogramarea metabolismului energetic 603
8. Sustragerea de sub controlul mecanismelor imunologice de apărare antitumorală 603
9. Invazia și metastazarea 604
10. Modele de evoluție multistadială a cancerelor 605
D. Predispoziția genetică în cancer 606
1. Cancerele ereditare 606
1.1. Neoplaziile endocrine multiple tip 2 (MEN2) 608
1.2. Retinoblastomul familial 609
1.3. Sindromul Li-Fraumeni 610

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.4. Cancerul colorectal nonpolipozic ereditar (HNPCC) 610
1.5. Polipoza adenomatoasă familială (FAP) 611
1.6. Cancerul de sân şi ovar ereditar 612
1.7. Neurofibromatoza familială 613
2. Cancerele familiale 615
3. Cancere cu predispoziţie genetică fără istoric familial 615
E. Noi perspective în diagnosticul şi tratamentul cancerelor 616
Bibliografie specifică selectivă 617

CAPITOLUL 19 – PROFILAXIA BOLILOR GENETICE

Cornel Popovici, Dragoş Ştefănescu, Francisc Mixitch, Cristina Gug, Mircea Covic

A. Principalele direcţii de profilaxie a bolilor genetice 619
B. *Screening*-ul populaţional al bolilor genetice 620
1. Principii de screening populaţional 621
2. *Screening*-ul prenatal 623
2.1. *Screening*-ul prenatal al DTN deschise 623
2.2. *Screening*-ul prenatal al sindromului Down 625
3. *Screening*-ul neonatal 627
3.1. *Screening*-ul neonatal pentru fenilcetonurie 628
3.2. *Screening*-ul neonatal pentru hipotiroidismul congenital 628
3.3. *Screening*-ul prenatal pentru fibroza chistică 628
4. *Screening*-ul populaţional al heterozigoţilor 629
5. *Screening*-ul familial 629
5.1. Diagnosticul presimptomatic 630
5.2. Registrele genetice 631
C. Diagnosticul prenatal 631
1. Indicaţiile diagnosticului prenatal 632
1.1. Criteriile de *screening* 621
1.2. Tipuri de *screening* populaţional 622
1.3. Servicii de *screening* 622
1.4. Probleme etice asociate *screening*-ului populaţional 623
2. Tehnicile curente de diagnostic prenatal 634
2.1. Ecografia fetală 634
2.2. RMN 637
2.3. Radiografia fetală 637
2.4. Fetoscopia 638
2.5. Metode de obţinere a materialului biologic fetal 638
2.6. Tehnici de analiză citogenetică 640
2.7. Tehnici de analiză moleculară 643
2.8. Determinări biochimice pentru boli metabolice 643
3. Tehnici speciale de diagnostic prenatal 643
3.1. Diagnosticul genetic preimplantatoriu 643
3.2. Analiza celulelor fetale din sângele matern 645
3.3. Analiza ADN fetal din sângele matern 645
4. Avantajele DPN 646
Bibliografie specifică selectivă 646

CAPITOLUL 20 – ABORDĂRI GENETICE ÎN TRATAMENTUL BOLILOR UMANE

Ionel Sandovici, Emilia Severin, Francisc Mixitch, Mircea Covic

A. Strategii de terapie a bolilor umane 647
1. Tehnologii genetice de producere a unor noi medicamente 647
2. Producerea de proteine terapeutice prin clonare de expresie 648
3. Producerea prin inginerie genetică de noi anticorpi şi aptameri cu potenţial terapeutic 649
4. Producerea de noi vaccinuri prin inginerie genetică 651
5. Metode de terapie bazate pe manipularea genetică a celulelor stem 652
5.1. Tipuri de celule stem 652
5.2. Dificultăţi practice în terapia cu celule stem 652

BCU IAŞI – CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.3. Metode de reprogramare nucleară 653
5.4. Aplicații terapeutice ale metodelor de reprogramare nucleară 656
6. Terapia genică 656
6.1. Terapia genică de înlocuire 656
6.2. Terapia genică de blocare 658
6.3. Terapia genică de corecție a genei mutante 660
6.4. Terapia genică în practica medicală 661
6.5. Considerații etice privind terapia genică 662
B. Terapia bolilor monogenice 663
1. Metode de tratament care acționează asupra substratului 664
2. Tratamentul tulburărilor metabolice sau biochimice asociate bolilor monogenice 665
2.1. Restricția dietetică a substratului 665
2.2. Utilizarea unor căi alternative de îndepărtare a metaboliților toxici 665
2.3. Utilizarea inhibitorilor metabolici 666
2.4. Înlocuirea produsului deficitar 666
3. Metode de tratament care acționează la nivelul proteinei deficitare 666
3.1. Stimularea funcției proteinei mutante 666
3.2. Înlocuirea proteinei mutante 667
4. Metode de tratament bazate pe modularea farmacologică a expresiei genice 667
5. Terapia celulară 668
6. Terapia genică 669
6.1. Boli monogenice pentru care există protocoale de terapie genică 669
Bibliografie specifică selectivă 669
..... 671

CAPITOLUL 21 – PROBLEME ȘI DILEME ETICE ÎN GENETICA MEDICALĂ

Cristina Gavrilovici, Marius Bembea, Mircea Covic, Vasile Astărăstoae

A. Aplicarea principiilor generale ale bioeticii în genetică 674
1. Respectarea autonomiei 674
2. Nonvătămarea și beneficiul persoanei 674
3. Păstrarea confidențialității și respectarea intimității 674
4. Respectul dreptății și echității 675
5. Dileme și conflicte etice 675
6. Datoriile medicilor confruntați cu boli genetice 675
B. Probleme etice specifice unor activități de genetică medicală 676
1. Sfatul genetic 677
2. Testarea genetică 677
2.1. Norme etice generale privind testarea genetică 680
2.2. Diagnosticul prenatal 680
2.3. Diagnosticul genetic preimplantator 682
2.4. Testarea presimptomatică sau predictivă 684
2.5. Folosirea informației genetice 684
3. *Screening*-ul populațional și familial 687
4. Terapia genică 687
5. Alte activități de genetică medicală 688
C. Reflecții bioetice asupra omului și umanității 689
1. Protecția vieții, corpului și speciei umane 689
2. Eugenia 689
Bibliografie specifică selectivă 690
..... 693

Bibliografie generală 695
Index 699

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 1

GENETICA UMANĂ ŞI IMPORTANŢA EI ÎN MEDICINA MODERNĂ

A. Conţinutul geneticii umane

1. Genetica – ştiinţa eredităţii şi variabilităţii

.1. Ereditatea

reditatea este proprietatea unui individ de *a ansmite la urmaşi* caracterele sale personale, recum şi cele ale speciei căreia îi aparţine. Acest roces realizează asemănarea biologică dintre ărinţi şi descendenţi.

Părinţii nu transmit însă la copii caractere, ci inormaţiile (conţinute în genele din gameţi) necesare pentru realizarea caracterelor. În acest context, *ereditatea este un proces informaţional* care presupune stocarea, expresia şi transmiterea informaţiei ereditare, pentru realizarea caracterelor unui individ. *Ereditatea este deci o funcţie*, esenţială pentru viaţă.

a) Acidul dezoxiribonucleic (ADN) este *substratul molecular al eredităţii*. Această macromoleculă, alcătuită din două catene polinucleotidice dispuse spaţial sub forma unei duble spirale elicoidale („*elicea vieţii*"), îndeplineşte trei roluri majore (figura 1.1):

- *ADN deţine informaţia genetică codificată* necesară pentru dezvoltarea şi funcţionarea tuturor organismelor vii (exceptând unele virusuri ARN). Totalitatea ADN şi deci a informaţiei din celulele umane se numeşte **genom**. Unitatea fundamentală de informaţie ereditară este **gena** – *un segment de ADN care conţine instrucţiunile necesare pentru sinteza unei proteine ce va determina un anumit caracter*. Genomul uman conţine circa 22.000 de gene. Modificarea structurii unei gene normale, numită **mutaţie**, produce o variantă genică („*alelă*"), normală sau anormală.
- *ADN exprimă informaţia ereditară*, prin sinteza unor proteine specifice, care vor determina caracterele morfologice şi funcţionale ale organismului („*o genă → o proteină → un caracter*") (figura 1.1.a).
- *ADN transmite informaţia ereditară* în succesiunea generaţiilor de celule şi organisme. Procesul se realizează prin biosinteza a două molecule noi şi identice de ADN, prin *replicare semiconservativă*, urmată de distribuţia lor egală şi totală, prin *diviziune celulară* (figura 1.1.b). Replicarea semiconservativă a ADN este „*cheia eredităţii*": un organism parental transmite prin gameţi o copie/replică a ADN său primei celule a descendenţilor, zigotul; o celulă produce, după replicare şi diviziune, două celule identice (prin ADN nuclear) între ele şi cu celula iniţială.

  Replicarea şi diviziunea se efectuează cu mare precizie, asigurând fidelitatea transmiterii informaţiei; ambele procese pot suferi totuşi erori, care generează mutaţii.

b) Aparatul genetic al celulei cuprinde structurile celulare ce conţin ADN: *nucleul şi mitocondriile*; de aceea genomul uman este alcătuit dintr-un **genom nuclear** şi un **genom mitocondrial.** Elementul principal al aparatului genetic este **nucleul**, „*centrul de comandă şi control*" al majorităţii activităţilor celulare. În nucleul interfazic, fiecare moleculă de ADN se asociază specific cu anumite proteine şi formează, prin spiralizări şi plieri succesive, **o fibră de cromatină**. La începutul diviziunii, fibra de cromatină se condensează şi formează un **cromozom**.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

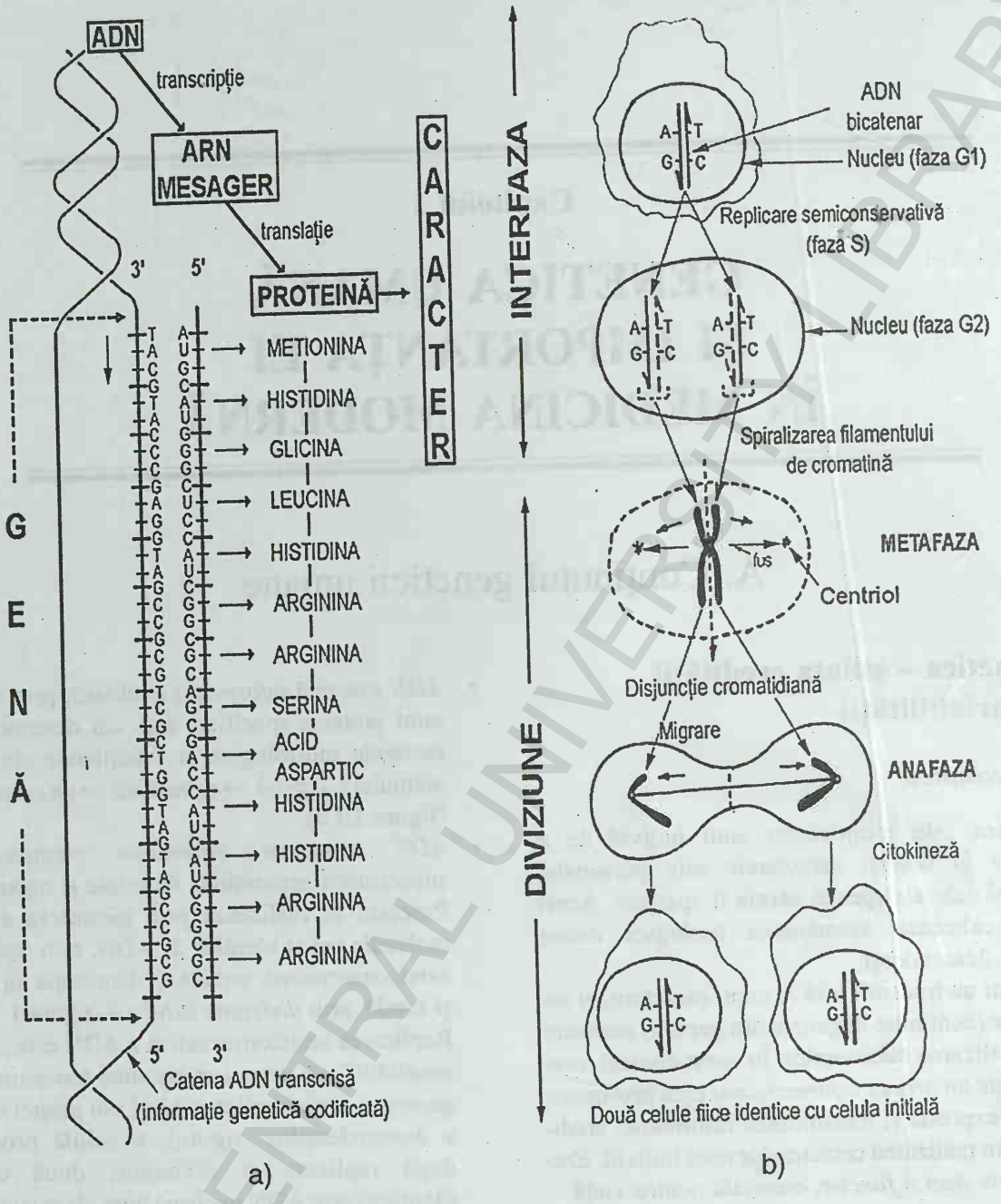


Figura 1.1. Reprezentarea schematică a funcțiilor ADN

a. Gena este un segment de ADN care deține informația genetică (codificată sub forma unei secvențe de nucleotide) necesară pentru sinteza unei proteine ce va determina un anumit caracter. Această informație este copiată (pe bază de complementaritate) în ARNm și apoi decodificată (translată) sub forma unei secvențe specifice de aminoacizi, constituind o proteină care stă la baza unui anumit caracter fenotipic.
b. Transmiterea informației genetice prin biosinteza ADN-ului (replicare semiconservativă) și diviziunea celulei.

Cromozomii reprezintă substratul morfologic al eredității; ei sunt organite *permanente* ale nucleului, dar vizibile numai în diviziune. *Numărul și forma cromozomilor sunt elemente caracteristice fiecărei specii*. La om, în celulele somatice, sunt *46 de cromozomi* (2n = număr diploid), 44 prezenți la ambele sexe (și numiți *autozomi*) și 2 *cromozomi sexuali*: XX la femeie sau XY la bărbat; în celulele sexuale mature (gameți) numărul de cromozomi este redus, prin meioză, la *23 de cromozomi* (n = număr haploid).

Mitocondriile conțin o mică parte din ADN celular (în medie 0,5%).

1.2. Variabilitatea

Variabilitatea reprezintă ansamblul fenomenelor care produc *diferențele genetice* dintre indivizii unei populații, precum și între populații diferite.

Sursele principale de variabilitate sunt *mutațiile*, *recombinările genetice* (care au loc în meioză, în timpul formării gameților) și *migrațiile* unor indivizi

dintr-o populaţie în altă populaţie (după încrucişarea lor se produc modificări în structura genetică a descendenţilor). Datorită proceselor de variabilitate, *fiecare individ are o structură genetică unică şi caracteristică.*

. Genetica umană – disciplină fundamentală, clinică şi medico-socială

enetica umană *studiază ereditatea şi variabi-atea fiinţelor umane.* Ea este o ştiinţă fundaentală şi aplicativă, care are un rol major în teoria practica medicală.

Genetica umană este o ştiinţă fundamentală, deoarece studiază *structurile, mecanismele şi legile* de bază ale stocării, transmiterii şi expresiei informaţiei ereditare pentru formarea, dezvoltarea şi funcţionarea organismului uman. Genetica umană are un rol important pentru *baza conceptuală a medicinei moderne.*

Genetica umană este şi o ştiinţă aplicativă, oarece studiază relaţia dintre ereditate şi boală ı, mai exact, *rolul mutaţiilor în producerea lilor sau predispoziţiei la boală.* Se cunosc peste .000 de boli cu o componentă genetică semniativă, care afectează 5-8% dintre nou-născuţi; ele o mare diversitate şi se regăsesc în aproape toate ecialităţile medicale. **Genetica medicală** – ca aplicaţie a geneticii umane[1] la medicină – este însă *o specialitate clinică distinctă,* care se ocupă de diagnosticul şi îngrijirea pacienţilor cu boli genetice, precum şi de familiile lor, confruntate cu riscul apariţiei bolii ereditare la alte persoane înrudite cu bolnavul (vezi capitolul 8). Genetica medicală are domenii (subspecialităţi) distincte (genetică clinică, citogenetică, genetică biochimică etc.) şi multiple interferenţe cu alte specialităţi, prin probleme comune de patologie genetică. Genetica medicală este domeniul de activitate al unor specialişti, dar fiecare medic practician trebuie să folosească o *abordare (gândire) genetică* în relaţia sa cu pacientul şi familia acestuia.

Genetica medicală este şi o disciplină medico-socială („*genetică comunitară*" sau „*genetica sănătăţii publice*") deoarece bolile genetice au devenit, în ultimii 30 de ani, „*probleme majore de sănătate publică*"[2]. Ele sunt numeroase, în ansamblul lor, frecvente (peste 5% nou-născuţi) şi au deseori consecinţe grave pentru individul afectat şi familia sa. Datorită caracterului lor cronic şi invalidant, bolile genetice influenţează negativ morbiditatea şi mortalitatea infantilă şi necesită cheltuieli medicale importante; de aceea, bolile genetice sunt o povară importantă pentru societate. În aceste condiţii, eforturile specialiştilor şi organizatorilor de sănătate publică trebuie să se finalizeze printr-un *sistem naţional de prevenire şi depistare precoce a bolilor genetice.*

B. Omul, ereditatea şi mediul

Formarea, dezvoltarea, structura şi funcţia organismului uman, în stare normală sau patologică, sunt dependente de „*cele două forţe*" care guvernează existenţa noastră: *ereditatea* şi *mediul.* De aceea, considerăm util ca în acest capitol introductiv să prezentăm „*o vedere panoramică*" a modului în care ereditatea şi mediul participă la realizarea caracterelor umane, normale sau anormale. Înaintea acestei prezentări vom sublinia o idee foarte importantă, cu multiple implicaţii în medicină, dar şi în viaţa socială: *fiecare fiinţă umană este unică,* prin structura sa genetică şi mediul în care s-a dezvoltat în timp.

1. Individualitatea genetică şi biologică

1.1. Individualitatea genetică

Fiecare fiinţă umană se formează dintr-o celulă iniţială, **zigotul**, rezultat prin fecundarea gameţilor haploizi: nucleul spermatozoidului se uneşte cu cel al ovulului şi formează nucleul zigotului, prima celulă a unei noi fiinţe. La zigot se reface astfel numărul diploid de 46 de cromozomi, caracteristic speciei umane, şi se stabileşte sexul genetic: XX sau XY. De fapt, se formează 23 perechi de **cromozomi**

1. *Genetica umană,* studiind toate aspectele eredităţii la om, este un domeniu mai amplu decât *genetica medicală* care cuprinde aplicaţiile geneticii în practica medicală.
2. Pentru ca o boală sau un grup de boli să fie „*o problemă de sănătate publică*" trebuie să îndeplinească trei condiţii: să aibă o frecvenţă mare, să necesite cheltuieli importante pentru îngrijirea bolnavilor şi să poată fi prevenită eficace, prin programe speciale.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

omologi, identici ca mărime, formă şi conţinut de gene, dar diferiţi ca origine, unul matern şi altul patern. În consecinţă, fiecare caracter este determinat de o pereche de gene, ce ocupă aceeaşi poziţie (*locus*) în cromozomii omologi; ele se numesc **gene alele.**

Zigotul reuneşte în nucleu genomurile parentale din gameţi într-o *combinaţie nouă, unică şi constantă* denumită individualitate genetică sau genotip. **Genotipul** este constituţia genetică a unei celule sau a unui organism/individ. Citoplasma zigotului este exclusiv de origine maternă. Deci mitocondriile din zigot, care conţin ADN, şi ulterior mitocondriile tuturor celulelor somatice *provin numai de la mamă.*

Cromozomii zigotului conţin în genele lor informaţia ereditară necesară pentru formarea caracterelor noului organism, precum şi pentru **programul genetic** al dezvoltării sale viitoare: fiecare individ parcurge în cursul existenţei sale biologice mai multe *etape succesive, obligatorii, diferite calitativ şi precis definite în timp*, ce constituie în ansamblul lor **dezvoltarea ontogenetică.**

1.2. *Individualitatea biologică*

Genetica modernă a demonstrat că *fiecare om este unic*, atât prin structura sa genetică (genotip), cât şi prin mediul în care s-a dezvoltat în timp.

Mediul cuprinde totalitatea factorilor ecologici (naturali) şi mai ales psihologici şi socioculturali care acţionează asupra omului, într-o anumită perioadă a dezvoltării sale ontogenetice. El determină unele caractere ale organismului şi influenţează realizarea multor caractere condiţionate primar de ereditate.

Cele două „forţe" care participă la formarea caracterelor noastre se condiţionează reciproc. *Ereditatea determină un potenţial* pentru formarea unor caractere, care se finalizează variat, în funcţie de condiţiile specifice de mediu socioeconomic şi cultural în care se dezvoltă o anumită persoană. Rezultă deci că *unicitatea omului este bio-psiho-socială.*

Ansamblul unic de caractere manifeste (observabile) şi specifice ale unui organism, produse prin interacţiunea permanentă, dar în proporţii diferite, dintre ereditate (genotip) şi mediu se numeşte **individualitate biologică** sau **fenotip.**

1.3. *Importanţa conceptului de individualitate genetică şi biologică*

Analiza rolului eredităţii şi mediului în determinismul caracterelor umane ne-a permis să precizăm două idei foarte importante: *unicitatea bio-psiho-socială* a fiecărei fiinţe şi *interacţiunea permanentă, dar în proporţii variate, a eredităţii şi mediului* (între „înnăscut şi dobândit") în geneza caracterelor umane, normale şi patologice. Aceste idei de bază ale conceptului de individualitate biologică au influenţe importante în gândirea şi practica medicală.

În medicină, individualitatea/unicitatea biologică a fiecărei persoane explică:

- *diferenţele de răspuns* ale fiecărui organism la agresiunile mediului şi deci vulnerabilitatea diferită a oamenilor la îmbolnăvire;
- *determinismul bolilor comune*, prin interacţiunea dintre structura genetică a unui individ (ce determină o anumită predispoziţie la boală) şi factorii agresivi din mediu;
- *manifestările variabile şi gravitatea* diferită ale aceleiaşi boli la pacienţi diferiţi;
- *răspunsul diferit, particular, la acelaşi tratament* aplicat unor bolnavi diferiţi, suferind de aceeaşi boală. Nu există tratamente general valabile pentru o boală, ci terapii adaptate la bolnavi, în funcţie de capacitatea lor de metabolizare a unui medicament.

Aforismul mai vechi, *„nu există boli, ci numai bolnavi"* capătă astfel o explicaţie corectă, eminamente genetică, şi determină acţiuni precise şi individualizate în diagnosticul şi tratamentul bolnavilor şi, mai ales, în profilaxia bolilor. În acest ultim domeniu, se va ajunge la o *prevenţie individualizată şi la o medicină predictivă şi personalizată*: în funcţie de expresia unor elemente ale structurii genetice individuale, moştenită de la părinţi, se va putea stabili ce riscuri de îmbolnăvire are o anumită persoană sau ce tratament este eficace pentru un anumit bolnav. Toate aceste elemente au influenţe importante şi în planul eticii medicale.

Conceptul de individualitate bio-psiho-socială are aplicaţii importante în educaţie şi viaţa socială.

În educaţie trebuie ţinut cont de faptul că factorii de mediu socioeconomici şi psihoculturali au o pondere importantă în realizarea potenţialului genetic individual şi formarea individualităţii noastre bio-psiho-sociale. În aceste condiţii, pentru o deplină realizare a potenţialului fiecărui individ, metodele educaţionale în familie şi şcoală trebuie reevaluate şi diferenţiate în funcţie de profilul individual al copilului.

- Mediul familial în care cresc copiii trebuie înţeles în toate componentele sale: material, afectiv şi cultural. Pentru realizarea integrală a potenţialului genetic intelectual componenta materială (locuinţă, hrană, îngrijiri medicale) şi afectivă sunt foarte importante, dar nu suficiente, mediul familial trebuind să ofere copiilor şi o componentă educaţională şi culturală adecvată. S-a

constatat că în condiţii relativ identice de mediu social, diferenţele de inteligenţă (IQ) dintre copii sunt corelate semnificativ cu ocupaţia părinţilor şi gradul de cultură al familiei. Devine evident că nivelul cultural scăzut al unor părinţi sau declinarea obligaţiilor educaţionale pe seama şcolii au efecte negative asupra dezvoltării copiilor.

În şcoală, învăţământul ar trebui diferenţiat în funcţie de posibilităţile, calităţile şi aptitudinile elevilor/studenţilor. Uniformizarea metodelor educaţionale generează inegalităţi individuale.

În viaţa socială, diversitatea genetică şi socio-ulturală a indivizilor este o premiză valoroasă de integrare, armonizare şi progres social. Oamenii sunt diferiţi şi aceasta le permite să aibă fiecare un rol social util şi să se completeze armonios în societate. Diferiţi nu înseamnă însă şi inegali. „*Egalitatea este un concept moral care a fost inventat tocmai pentru că fiinţele umane nu sunt identice*" (F. Jacob). Genele nu sunt egale sau inegale, ci pur şi simplu diferite, determinând calităţi şi aptitudini ferite. Diversitatea este cel mai valoros capital al eciei umane.

Capacităţile şi aptitudinile individuale ar trebui losite adecvat, după formula „omul potrivit la cul potrivit", deoarece fiecare om poate fi valoros r-un anumit domeniu. Aceasta presupune selecţia, formarea şi promovarea valorilor, înţelegând prin „valori" orice calităţi deosebite, utile societăţii. „*Curajul de a recepţiona valoarea şi de a sprijini direct afirmarea ei este o demonstraţie de mare şi adevărat patriotism*" (M. Maliţa).

Se poate conchide că „... *spiritul şi cultura îi permit omului să nu fie total dependent de moştenirea sa ereditară, dobândindu-şi adevărata libertate de fiinţă bio-psiho-socială*" (Wilson). În acest context, exagerarea rolului factorilor genetici, de către aşa-numita **sociobiologie**, considerându-se că structura genetică cu care s-a născut un individ va determina (ca un destin implacabil) tot ce va face el în cursul vieţii, precum şi fundamentarea inegalităţilor sociale pe baza aşa-zisei inegalităţi genetice a oamenilor sunt idei absurde şi periculoase.

2. Determinismul caracterelor fenotipice

Caracterele fenotipice normale sau anormale ale organismului sunt produse prin acţiunea eredităţii (genotipului) şi mediului. În funcţie de ponderea celor doi factori cauzali, se pot deosebi teoretic trei categorii de caractere (figura 1.2): caractere pur ereditare; caractere determinate de interacţiunea ereditate – mediu; caractere pur ecologice (neereditare).

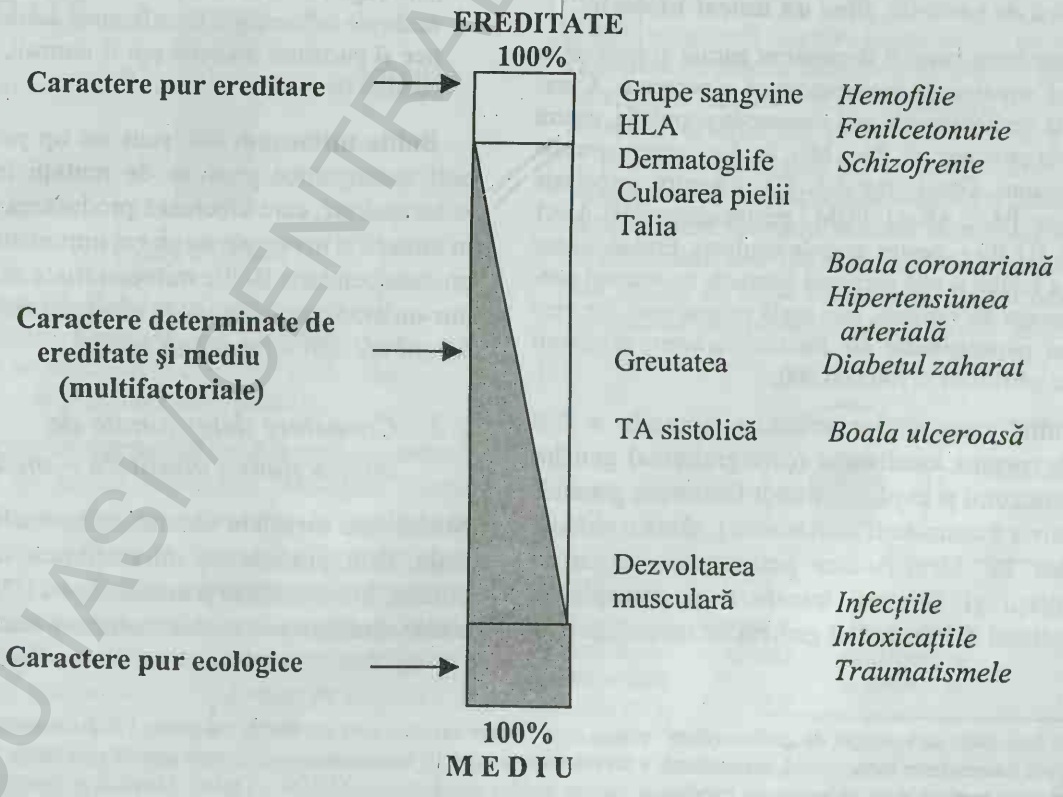


Figura 1.2. Determinismul caracterelor fenotipice, normale şi anormale, realizate prin interacţiunea dintre ereditate şi mediu

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.1. Caractere fenotipice pur ereditare

Caracterele pur ereditare sunt *determinate exclusiv de structura genetică*, normală sau modificată, a unui individ, deci de către genotip. Caracterele pur ereditare sunt de trei feluri: caractere de specie, caractere ereditare normale, caractere anormale/boli genetice.

a) Caracterele de specie sunt *strict genetice*: fiecare specie are o anumită structură genetică, ordonată într-un *set fix şi caracteristic de cromozomi*, cu o anumită morfologie. Această configuraţie specifică realizează o „barieră" reproductivă între specii.

b) Caracterele ereditare normale sunt determinate *monogenic* şi *transmise* în concordanţă cu legile lui Mendel, după reguli precise, într-un mod predictibil. Ele sunt reprezentate de diferite *sisteme grupale*: grupele sanguine (ABO, Rh, MN etc.), serice (haptoglobine, transferine, ş.a.), enzimatice (fosfatază acidă etc.) şi tisulare (antigenele HLA).

Marea majoritate a acestor sisteme sunt *polimorfice*[3], găsindu-se în populaţie în mai multe variante (de exemplu, grupele A, B, AB şi O pentru sistemul ABO); un individ posedă însă numai *o anumită variantă* dintr-un sistem. Datorită numărului mare de sisteme polimorfice (>30) şi de variante în fiecare sistem, *un individ posedă o combinaţie specifică de variante, fiind* **un unicat biologic!!!**

> Acest lucru poate fi demonstrat parţial şi indirect în felul următor: să presupunem că o persoană X prezintă variantele cele mai comune în populaţie, pentru 30 de caractere (O, Rh+, MN, Se, Le – pentru grupele sanguine; Gm-1, Hp 2-1, C3 – pentru proteinele serice; PA-c, AK-11, PGM 1 pentru enzime; HLA: A1 A3, B7 B8 – pentru grupele tisulare). Probabilitatea de a întâlni o altă persoană identică, cu aceeaşi configuraţie de variante, este egală cu produsul frecvenţelor populaţionale ale fiecărui caracter; rezultatul este edificator 1:700.000.000.

Studiul caracterelor ereditare normale a fost utilizat, pentru localizarea (cartografierea) genelor pe cromozomi şi explicarea unor fenomene genetice (inclusiv a transmiterii mendeliene); el are o *valoare practică* în: identificarea persoanelor, expertiza paternităţii şi filiaţiei, transfuzii şi transplante, diagnosticul diferenţial al gemenilor monozigoţi şi dizigoţi, identificarea persoanelor vulnerabile la diferite îmbolnăviri etc.

c) Caracterele ereditare anormale sunt produse de *mutaţii* şi reprezentate de bolile cromozomiale, bolile monogenice şi bolile mitocondriale.

Bolile cromozomiale sunt produse de *adiţia (trisomie) sau pierderea (morosomie) unui cromozom întreg sau a unei părţi din cromozom*; de exemplu, sindromul Down (trisomia 21) sau sindromul Turner (monosomia X).

Bolile monogenice sunt produse de *mutaţia unei gene (din genomul nuclear) cu efect major*, care determină boala prin anomalii ale unor proteine de structură (colagen, elastină etc.), proteine cu rol funcţional (hemoglobină, factori de coagulare etc.) sau enzime (erori înnăscute de metabolism etc.). Aceste mutaţii se *transmit* în succesiunea generaţiilor după tipul mendelian[4]: autozomal dominant (de exemplu, *hipercolesterolemie familială*), autozomal recesiv (de exemplu, *fibroza chistică*) sau legat de X (de exemplu, *hemofilia*). Cu toate că sunt „pur" genetice, manifestarea unora din aceste boli poate fi influenţată pozitiv prin intervenţie medicală, deci de anumite condiţii de mediu.

> De exemplu: **Fenilcetonuria** (PCU) este o boală ereditară (OMIM # 261600) care evoluează spre retard mental sever. Ea poate fi prevenită prin depistarea la naştere a bolnavilor (*screening* neonatal) şi folosirea unui regim dietetic fără fenilalanină; ambele acţiuni medicale influenţează manifestarea acestei boli genetice şi purtătorii mutaţiei pot fi normali, în anumite condiţii de mediu.

Bolile mitocondriale sunt un tip particular de boli monogenice produse de mutaţii în *genomul mitocondrial*, care afectează producerea de energie în muşchi şi nervi; ele au un rol important în diferite procese celulare. Bolile mitocondriale se moştenesc într-un mod particular: *de la mamă la toţi copiii, dar băieţii afectaţi nu transmit boala*[5].

2.2. Caractere determinate de interacţiunea ereditate – mediu

Numeroase caractere fenotipice, normale sau anormale, sunt produse de interacţiunea, în proporţii diferite, dintre ereditate şi mediu (figura 1.2). De aceea, aceste caractere sunt numite *caractere multifactoriale*.

3. Prin convenţie se vorbeşte de „*polimorfism*" atunci când fiecare caracter este prezent la cel puţin 1% din populaţie.
4. Despre transmiterea monogenică, mendeliană, a caracterelor normale şi bolilor monogenice vom discuta mai târziu, în capitolul 5. Aici vom preciza doar că există un catalog al tuturor bolilor monogenice (OMIM – *Online Mendelian Inheritance of Man*. www.ncbi.nlm.nih.gov/omim) în care fiecare afecţiune este înregistrată printr-un număr de cod: *fenilcetonuria – OMIM# 261600*.
5. Transmiterea *pe linie maternă* se explică prin faptul că toate mitocondriile zigotului provin, prin citoplasma ovulului, exclusiv de la mamă.

a) Caracterele multifactoriale normale sunt determinate de interacţiunea variabilă dintre ereditate şi mediu; de exemplu: talia, greutatea, tensiunea arterială, inteligenţa etc. În realizarea acestor caractere multifactoriale, ereditatea determină *o parte din caracter*, mai mare sau mai mică (denumită *„heritabilitate"*), precum şi *limita superioară* sau **potenţialul genetic** până la care poate fi dezvoltat acel caracter, în cele mai favorabile condiţii de mediu (figura 1.3). Mediul produce *o altă parte din caracter* şi determină sau nu atingerea limitei superioare sau *realizarea potenţialului genetic* individual.

De exemplu: talia – este condiţionată genetic în proporţie de 67%. Fiecare individ are o „limită superioară" determinată genetic, până la care poate creşte şi pe care *nu o poate depăşi*. Ea este o caracteristică familială, fiind determinată de talia părinţilor. Atingerea acestei limite depinde de mediul de viaţă al individului. Aşa se explică faptul că gemenii monozigoţi (care au o ereditate identică), crescuţi în medii diferite, vor avea înălţimi diferite, iar populaţii genetic diferite ce trăiesc în acelaşi mediu vor avea talii diferite.

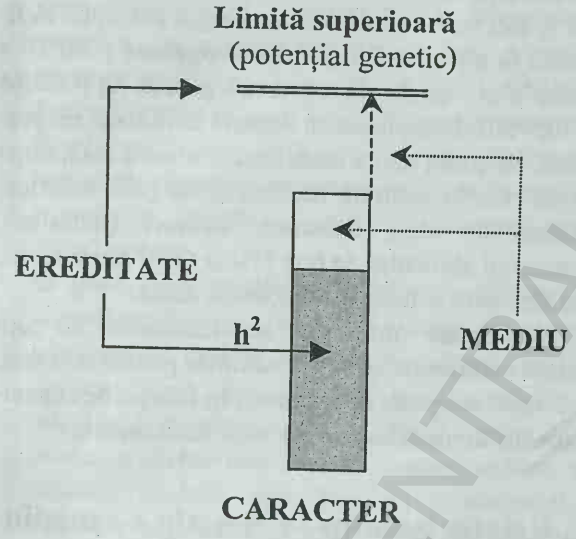


Figura 1.3. Rolul eredităţii şi mediului în realizarea caracterelor multifactoriale
(h^2 = *heritabilitate* = contribuţia eredităţii la realizarea caracterului)

Un genotip nu determină întotdeauna un *anumit fenotip*, ci *un şir de capacităţi fenotipice* numit **„normă de reacţie"** a individului la mediu sau potenţial genetic. Datorită interacţiunii cu alte gene şi cu mediul, un acelaşi genotip poate determina fenotipuri diferite sau, mai exact, variaţii de manifestare ale aceluiaşi caracter. *„Genotipul este «partitura», iar fenotipul este «simfonia» pe care noi o auzim, marcată de personalitatea şefului de orchestră, minunată sau fără strălucire, după calităţile executanţilor"* (A. Jaquard). De aceea, Aristotel avea dreptate spunând că *„...natura omului nu este cea cu care s-a născut, ci aceea pe care el o poate dezvolta"*. Potenţialul nostru genetic ne permite să ne adaptăm la cele mai variate condiţii de mediu, dar, firește, nu putem depăşi anumite limite. În condiţii obişnuite nici nu există un asemenea risc; *există însă pericolul de a folosi incomplet, subliminal, potenţialul genetic al organismului.*

b) Caracterele multifactoriale anormale sunt reprezentate de *anomaliile congenitale* izolate (de exemplu, malformaţiile congenitale de cord, spina bifida, despicăturile labio-maxilo-palatine etc.) şi de numeroase *boli comune ale adultului* (hipertensiunea arterială esenţială, boala coronariană, diabetul zaharat, ulcerul gastric/duodenal, cancerul etc.).

În producerea acestor boli, factorii ereditari (reprezentaţi, de obicei, prin mai multe gene, poligenie) şi factorii de mediu *interacţionează* permanent şi complex. De aceea, aceste afecţiuni au un determinism etiologic (cauzal) complex şi se numesc **boli multifactoriale** sau **boli complexe**. Prevalenţa lor este mare (≥ 5% din populaţie), pot avea o *distribuţie familială*, dar NU se transmit mendelian (!). De cele mai multe ori, factorii genetici realizează o **predispoziţie genetică** (PG), o *vulnerabilitate* individuală la îmbolnăvire. Bineînţeles, nu toţi indivizii predispuşi se îmbolnăvesc, deoarece este necesară şi intervenţia factorilor de mediu (M) care transformă predispoziţia în boală (figura 1.4). Boala apare deci prin *interacţiunea obligatorie* dintre ereditate şi mediu (PG + M = B).

Astfel, persoanele cu *grupa sanguină O şi nesecretori* (deoarece nu elimină antigenele de grup sanguin prin secreţii) fac mai frecvent ulcer duodenal, dar sunt mai rezistenţi la infecţiile virale. Indivizii *negustători* (care nu simt gustul amar al unor substanţe) se îmbolnăvesc mai des de guşă nodulară decât cei „gustători", dacă consumă substanţe naturale antitiroidiene (care au gust amar). Indivizii cu haptoglobina *Hp2-2* au un risc crescut de boală coronariană. Riscul relativ al persoanelor care posedă antigenul *HLA B27*, de a face

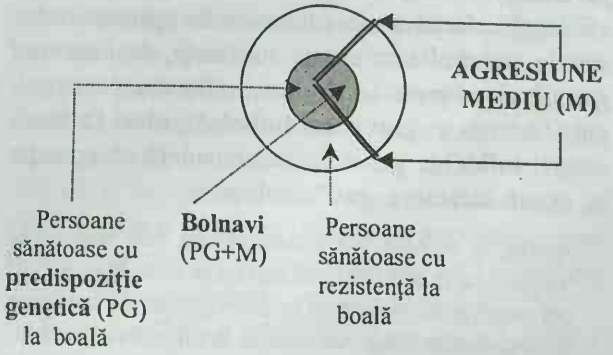


Figura 1.4. Rolul predispoziţiei genetice şi al factorilor de mediu în producerea bolilor multifactoriale

BUCUR CENTRAL LIBRARY

boli reumatismale cronice este de 120 de ori mai mare decât la cei care nu au acest antigen.

Identificarea factorilor care determină predispoziția genetică la îmbolnăvire, precum și a persoanelor predispuse genetic, reprezintă modalități importante pentru *profilaxia* bolilor comune ale adultului, prin descoperirea și evitarea factorilor de mediu care transformă predispoziția în boală. Deoarece genele ce determină predispoziția la boală se transmit în familie, se poate spune că *„nu există boli ci... familii de bolnavi"*. Acest fapt este deosebit de important în practica medicală, întrucât *extinde obligatoriu atribuțiile medicului* de la bolnav la familia lui.

c) Bolile prin mutații somatice sunt produse prin efectul cumulativ al unor mutații somatice succesive, în gene diferite, unele determinate de factori de mediu, altele prin erori de replicare a ADN. Exemple sunt marea majoritate a cancerelor și multe boli autoimune. Aceste boli se produc *după concepție*, sunt *limitate la celulele somatice* și deci *NU se transmit la descendenți*. Într-un procent mic de cazuri o mutație inițială (importantă, dar nu suficientă pentru producerea bolii) se poate moșteni de la unul din părinți, producând o predispoziție genetică la boală (de exemplu, mutația genei *BRCA1* în cancerul de sân familial).

2.3. *Caractere fenotipice determinate de mediu*

a) Caractere ecologice. *Mediul extern* este reprezentat de diferiți agenți fizici, chimici sau biologici care pot produce deseori *îmbolnăviri*: arsuri, traumatisme, boli de iradiere, intoxicații, infecții. Aceste boli sunt aparent negenetice.

Dar, foarte probabil, exceptând accidentele, *efectele agresiunilor exogene asupra organismului sunt influențate de structura genetică, specifică fiecărei persoane*. Genotipul individual determină o eficiență diferită a mecanismelor de apărare imună sau de metabolizare a unor substanțe, deci *un mod specific de răspuns la agresiuni*, influențând apariția, manifestarea și gravitatea îmbolnăvirilor. Datorită acestei influențe genetice, se consideră că aproape nu există caractere „pur" ecologice.

Astfel, în *infecții*, s-a constatat, din cele mai vechi timpuri, că în diferite epidemii nu se îmbolnăvesc toți cei care vin în contact cu microorganismele patogene și că gravitatea bolii variază de la un individ la altul. Astăzi se știe că vulnerabilitatea sau rezistența la infecții (vezi capitolul 9) este determinată de constituția genetică a fiecărei persoane și, în special, de structura proprie de antigene HLA, „sistemul de supraveghere, alarmă și apărare imunologică a organismului" (vezi capitolul 17). Unele combinații (de exemplu: A1 – B8 – DR3) produc un răspuns umoral puternic și cei care le posedă sunt mai bine protejați de acțiunea microorganismelor patogene, dar pot face boli autoimune; alte combinații (de exemplu, A3 – B7 – DR2) dau un răspuns mult mai slab. Ce genială previziune a avut Claude Bernard afirmând, la sfârșitul secolului al XIX-lea: *„microbul nu-i nimic, terenul este totul!"*.

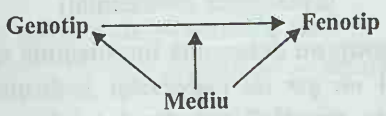
b) Ecogenetică și farmacogenetică. Studiul *variațiilor individuale determinate genetic la acțiunea factorilor externi* se realizează astăzi de către o ramură a geneticii umane numită **ecogenetică** (vezi capitolul 9). De exemplu, *alergenii* induc astm la persoanele susceptibile (atopie); *laptele* sau *alcoolul* nu sunt tolerate de persoanele cu deficiențe în lactază și, respectiv, alcooldehidrogenază.

Ecogenetica include și **farmacogenetica** care studiază diferențele genetice individuale în răspunsul organismelor la acțiunea medicamentelor. Această problemă va fi discutată pe larg în capitolul 9, aici vom aminti doar un singur exemplu: *deficiența în glucoză-6-fosfat dehidrogenază (G6PD)* a globulului roșu (boală recesivă legată de X) (OMIM # 305900). Persoanele cu această deficiență nu prezintă, obișnuit, nici o manifestare clinică însă, după expunerea la anumite medicamente (antimalarice, furazolidon etc.), substanțe chimice (naftalen), consumul alimentar de bob (*Vicia fava)* sau infecții, ele dezvoltă o anemie hemolitică acută.

Numeroase observații au demonstrat că *„nu există tratamente general valabile pentru o boală, ci terapii adaptate la bolnavi"*, în funcție de capacitatea lor de metabolizare a unui medicament.

3. Relația genotip → fenotip ← mediu

Interacțiunea dintre ereditate și mediu se poate exprima sintetic prin relația:



Reamintim că prin *genotip* se înțelege structura genetică unică și caracteristică unui individ, care se stabilește în momentul fecundării și rămâne *stabilă* în cursul dezvoltării. Prin termenul de *fenotip* se definește totalitatea caracterelor manifeste/observabile și specifice ale unui organism, determinate de interacțiunea genotipului cu mediul în care trăiește acel organism. Dependent de ereditate și mediu, *fenotipul este variabil*, se poate schimba.

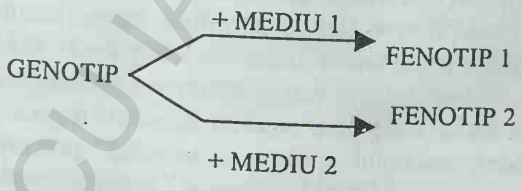
3.1. Relaţia genotip → fenotip

Relaţia genotip → fenotip[6] este o relaţie *cauzală*, dar *nu este totală* deoarece unele gene (*recesive*) nu se manifestă fenotipic, iar o parte din caracterele fenotipice sunt produse de mediu. Caracterele fenotipice determinate de genotip sunt *caractere pur ereditare* (de exemplu, grupele sangvine, serice, enzimatice, tisulare).

Relaţia genotip → fenotip este însă mult mai *complexă*. Fără a intra în detalii (pe care le vom discuta în capitolul 4), vom menţiona succint trei fenomene: heterogenitatea genetică, o genă – mai multe boli şi expresivitate variabilă.

- **Heterogenitatea genetică** *este fenomenul prin care genotipuri diferite se pot manifesta fenotipic identic*. De exemplu, mutaţii în genele pentru factorii VIII şi IX ai coagulării, gene situate în loci diferiţi pe cromozomul X, se manifestă clinic asemănător, prin hemoragii importante la traumatisme minime (datorită perturbării coagulării); aceste două mutaţii diferite produc *hemofiliile A* şi *B*. Conceptul de heterogenitate genetică are o deosebită *importanţă practică* pentru realizarea unui diagnostic etiologic (cauzal) precis al unor boli diferite, cu manifestare identică; pe această bază, se va putea face un tratament eficace (adecvat cauzei) şi se va realiza o evaluare corectă a riscului de recurenţă, prin sfatul genetic.

  O genă, mai multe boli. Mutaţii diferite în aceeaşi genă pot produce boli diferite. De exemplu, mutaţii variate în gena β-globinei produc *drepanocitoză, β-talasemie, methemoglobinemie*. Un alt exemplu: mutaţii diferite în gena *RET* produc o formă familială de cancer medular al tiroidei (izolată sau asociată sindroamelor MEN2A şi MEN2B; MEN – de la *Multiple Endocrine Neoplasia*) precum şi megacolonul congenital (boala Hirschprung).
- **Expresivitatea variabilă.** Aşa cum am precizat, genele determină un potenţial genetic care se poate realiza diferit în funcţie de mediu şi interacţiunea cu alte gene, determinând *„variaţiile în expresia unor gene”*, de tipul penetranţă, expresivitate variabilă, etc. (vezi capitolul 5D).



3.2. Relaţia mediu → fenotip

Relaţia mediu → fenotip este o *relaţie cauzală*, dar caracterele fenotipice produse de mediu (numite şi „modificaţii”) sunt *neereditare*. Ele sunt, cel mai adesea, caractere anormale sau boli produse de agenţi fizici, chimici sau biologici: arsuri, traumatisme, intoxicaţii, avitaminoze şi mai ales infecţii. Dar, aşa cum am mai precizat, exceptând accidentele, efectele agresiunilor mediului asupra organismului sunt influenţate de structura sa genetică specifică.

Uneori, caracterele fenotipice produse de mediu *se manifestă identic* sau foarte asemănător cu caracterele fenotipice produse de genotip. De exemplu, *microcefalia*[7] poate fi produsă de o infecţie fetală sau de o mutaţie genică. Diferenţierea cauzală în aceste cazuri, cunoscute sub numele de **fenocopii**, este foarte importantă în evaluarea riscului de recurenţă la sarcinile următoare: în primul caz (microcefalia produsă de factorii de mediu) riscul de recurenţă este practic nul, dacă se evită o nouă agresiune; în al doilea caz, riscul este mare şi depinde de tipul mutaţiei.

B.C.U. „M. EMINESCU” IAŞI BIOLOGIE

3.3. Relaţia mediu → genotip

Mediul poate acţiona direct asupra genotipului producând modificări ale materialului genetic sau **mutaţii**. Ele pot afecta structura genei sau a cromozomilor şi pot avea consecinţe variate: unele modificări generează fenotipuri mutante anormale, altele determină variantele polimorfice normale pe care le prezintă un caracter.

3.4. Relaţia genotip → fenotip → mediu la nivel molecular

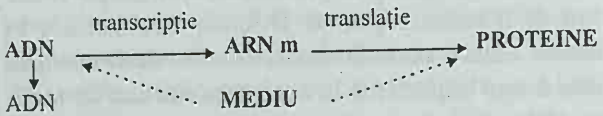
Relaţia dintre genotip şi fenotip îşi dezvăluie întreaga sa semnificaţie atunci când este analizată la nivel molecular. Termenul de genotip poate fi substituit prin însuşi substratul material al genelor: molecula de ADN. Caracterele fenotipice sunt determinate de proteine structurale (colagen, oseină, elastină, hemoglobină ş.a.) sau enzime. În acest fel, relaţia genotip → fenotip devine: ADN → PROTEINE şi se traduce prin ideea fundamentală că ADN deţine şi exprimă informaţia necesară pentru sinteza proteinelor, ce constituie suportul biochimic al caracterelor ereditare ale organismului.

Relaţia ADN → PROTEINE se poate nuanţa şi completa, dacă ţinem cont de următoarele elemente:

6. Termenii de genotip şi fenotip se pot referi *la toate* genele şi caracterele organismului sau, în sens restrâns, *la o pereche* de gene alele de pe cromozomii omologi care determină un caracter.
7. Reducerea perimetrului cranian sub – 2 DS (deviaţii standard) însoţită de retard mental

- expresia informației ereditare nu se face direct; ea este copiată prin procesul de *transcripție* într-o moleculă de ARNm, care trece în citoplasmă, unde are loc sinteza proteinei (*translație*);
- informația genetică din molecula de ADN se poate transmite (conserva) în succesiunea generațiilor, prin *replicare semiconservativă*, formându-se molecule de ADN identice;
- fiecare element și etapă a relației poate fi *influențată de mediu*.

Pe baza acestor date, relația ADN → PROTEINE poate fi „reformulată". Obținem astfel o nouă relație, denumită frecvent **dogma centrală sau fundamentală a geneticii**.



Așa cum vom vedea în capitolul 3 acest principiu, formulat la începuturile geneticii medicale, deși rămâne în general valabil, a suferit unele completări; de exemplu relația ADN ⇄ ARN este bidirecționată.

4. Omul – subiect de studiu al geneticii umane

a) Dezavantaje. În comparație cu alte organisme, ființa umană pare, la prima vedere, un „material" de studiu genetic care prezintă suficiente inconveniente: diversitatea genetică a indivizilor, mare și necontrolată; dificultatea studiilor genealogice; numărul mic al subiecților observați; dispersia geografică etc.; în plus, nu se pot face experiențe genetice pe om.

b) Avantaje. În realitate, omul a devenit rapid un subiect important pentru cercetările genetice, deoarece este *ființa cea mai bine studiată*. Sunt disponibile pentru cercetări populații mari, în care se pot analiza numeroase și variate tipuri de mutații, veritabile „experimente" ale naturii. Prin folosirea unor metode adecvate, inclusiv a unor tehnici noi de culturi celulare și analiză moleculară, pot fi depășite dificultățile inerente ale studiilor familiale. În plus, a fost „descifrată" secvența completă a genomului uman precum și structura și funcția multor gene. Se poate conchide fără rezerve că omul reprezintă un subiect deosebit de interesant pentru studiile genetice.

C. Istoria geneticii umane

Relația dintre genetică și medicină trebuie analizată dintr-o perspectivă istorică, urmărind modul în care *evoluția geneticii a interferat și influențat în timp evoluția medicinei*, ajungând la stadiul actual de „medicină genomică sau moleculară". Interacțiunea dintre medicină și genetică a fost permanentă, bidirecțională și foarte productivă, mai ales în ultimele decenii. Vom prezenta în mod succint și schematic principalele etape și evenimente din evoluția geneticii umane.

1. Etapa preștiințifică (→ 1865)

În această primă etapă s-au realizat, timp de secole, numeroase observații corecte privind *agregarea familială și transmiterea ereditară a unor boli*[8] (hemofilie, polidactilie, albinism); numeroase interpretări erau însă eronate. Etapa preștiințifică se caracterizează prin lipsa cunoștințelor privind procesele de bază (reproducere, dezvoltare etc.), eludarea analizei și absența unei teorii generale, convingătoare, care să explice fenomenele ereditare.

2. Etapa fundamentării geneticii ca știință și a introducerii sale în medicină (1865 → 1960)

Fundamentarea geneticii ca știință a fost făcută de către Gregor Mendel (1865), care introduce *conceptul genei* și formulează *legile eredității*, și Charles Darwin, care demonstrează importanța biologică a *variațiilor ereditare în evoluție*. La începutul secolului XX, prin contribuția mai multor cercetători, dar mai ales a lui Thomas Hunt Morgan (primul premiu Nobel pentru genetică) se formulează *teoria cromozomială a eredității*. Apar primele studii de *genetică în medicină*: Francis Galton (1890) analizează unele caractere umane complexe, „cantitative" (talia, inteligența), introduce conceptul interacțiunii dintre ereditate și mediu, inițiază studiul gemenilor și dermatoglifelor; Archibald Garrod (1902) introduce mendelismul în medicină prin studiul primelor *„erori înnăscute de metabolism"* (alcaptonuria, albinismul, cistinuria și pentozuria) transmise ereditar conform legilor lui Mendel, conceptul *„o genă – o proteină"*, precum și ideea *„individualității biochimice"*, prin care explică

8. Hippocrate notează în textele sale că *„ereditatea afectează sănătatea"*.

BCU "CAROL I" BUCUREȘTI LIBRARY

răspunsurile diferite la droguri şi infecţii ale unor persoane diferite.

În deceniile cinci şi şase începe *era geneticii moleculare* sau *era ADN*, prin demonstrarea rolului genetic al ADN (Avery *et al.*, 1944), descoperirea modelului structurii ADN (Watson şi Crick, 1953), a replicării ADN, codului genetic, expresiei şi reglării genice.

Apariţia *geneticii medicale* – ca domeniu de aplicare a geneticii în medicină – a fost determinată de două descoperiri remarcabile: Linus Pauling (1949) demonstrează că o boală ereditară, *anemia hemolitică cu hematii în seceră* (sicklemia sau drepanocitoza) este produsă de o hemoglobină anormală (Hb S), care se deosebeşte de Hb A, normală, prin înlocuirea unui singur aminoacid; sicklemia devine *prima boală moleculară* identificată la om; Jérôme Lejeune (1959) descoperă *prima anomalie cromozomială* la om, trisomia 21, cauza sindromului Down.

3. Dezvoltarea geneticii medicale (1960 → 1980)

În aceste două „decenii de aur" se acumulează numeroase dovezi privind rolul important al factorilor genetici în producerea bolilor umane. Concomitent cu reducerea marcată a frecvenţei bolilor infecţioase şi nutriţionale, a devenit evident că bolile genetice au condiţionate genetic reprezintă, cel puţin în ţările dezvoltate, *o cauză majoră de morbiditate şi mortalitate, o problemă de sănătate publică.*

S-au amplificat *aplicaţiile practice ale geneticii medicale*, care capătă o *pondere tot mai importantă în practica medicală*; dintre acestea menţionăm: perfecţionarea diagnosticului bolilor metabolice şi a depistării sistematice la nou-născuţi (*screening*-ului neonatal) a unor boli frecvente şi tratabile (fenilcetonuria, hipotiroidia congenitală); ameliorarea tehnicilor de analiză cromozomială, prin metode noi de marcaj în benzi, care permit identificarea precisă a unor anomalii structurale minime; dezvoltarea sfatului genetic (evaluarea riscului de apariţie a unor boli genetice în familii); introducerea şi amplificarea diagnosticului prenatal; optimizarea tratamentului simptomatic şi patogenic în diferite boli genetice, care încetează să mai fie *„fără speranţe terapeutice"*.

4. Dezvoltarea geneticii şi a medicinei moleculare (1980 → 2003)

a) Revoluţia metodologică a geneticii moleculare

Până în anul 1970, genele erau entităţi virtuale, inaccesibile analizei biochimice. La începutul deceniului opt se descoperă tehnici performante de *izolare şi analiză directă a ADN* (*„Sfântul Graal" al biologiei moleculare*) şi *genelor*. Ele au permis: identificarea şi localizarea unor gene; izolarea şi multiplicarea lor (clonare celulară sau acelulară, prin PCR); descifrarea „mesajului" genelor (prin secvenţierea ADN); analiza mutaţiilor; expresia genelor umane în diferite celule „gazdă", în care se obţin proteinele codificate de genă (ex., insulină, hormon de creştere, eritropietină, ş.a.). Aceste tehnici de „manipulare genetică" sau **„ADN recombinant"** reprezintă o veritabilă *„inginerie genetică"*.

Genetica iese din cadrul său abstract şi începe *o nouă eră, cea a geneticii moleculare*. Ea produce o veritabilă revoluţie în biologie, deoarece deschide calea înţelegerii marilor enigme: originea vieţii, evoluţia, speciaţia, diferenţierea celulară şi morfogeneza, senescenţa, organizarea şi funcţionarea sistemului nervos şi imun, cancerul etc. Iniţial, noile metodologii ale geneticii moleculare au fost receptate de către lumea ştiinţifică cu justificată teamă, atribuindu-li-se pericolul unor consecinţe nefaste şi necontrolabile. Rezervele s-au dovedit ulterior mai puţin justificate şi, treptat, „ingineria genetică", simplificându-şi procedurile iniţiale, luând măsuri speciale de limitare a pericolelor potenţiale şi crescându-şi gradul de accesibilitate, a „invadat" toate sectoarele biologiei şi, în special, medicina.

Deşi au trecut doar 25-30 ani de la introducerea noilor tehnologii de studiu direct al genei, aceste descoperiri, recompensate cu numeroase premii Nobel (tabelul 1.1), au generat *consecinţe majore pentru genetica umană, dar mai ales pentru teoria şi practica medicală.*

Restructurându-şi elementele sale fundamentale, prin introducerea *anatomiei şi fiziologiei genice*, medicina anilor '90 devine o **medicină moleculară**. Eforturile şi realizările cele mai mari s-au făcut în domeniul *elucidării mecanismelor moleculare de producere a bolilor*. Afecţiunile genetice au fost, firesc, primul beneficiar al aplicării noilor tehnici de analiză moleculară. Concomitent s-a produs însă o extensie a câmpului de acţiune a patogeniei moleculare la *bolile comune*: cancerul, boala coronariană, diabetul zaharat, hipertensiunea arterială etc. încercându-se descoperirea genelor implicate în predispoziţia la boală.

Pe baza cunoaşterii mecanismelor moleculare s-au introdus noi metode de diagnostic şi tratament, care se adresează *moleculelor implicate în procesele patologice.*

- În plan diagnostic, perfecţionarea metodelor de analiză moleculară, la nivel genic, a permis ameliorarea capacităţii de identificare a unor boli, indiferent de vârsta pacientului (făt, nou-născut,

Tabelul 1.1. Lista laureaților Premiilor Nobel pentru descoperiri în domeniul geneticii*
(sursa Wikipedia)

Anul	Laureați	Descoperire
1933	Thomas Hunt Morgan	Rolul cromozomilor în ereditate
1946	Herman Joseph Muller	Producerea unor mutații prin iradiere cu raze X
1958	George W. Beadle, Edward L. Tatum, Joshua Lederberg	Acțiunea genelor, organizarea materialului genetic și recombinarea genetică la bacterii
1959	Arthur Kornberg, Severo Ochoa	Mecanismul biosintezei acizilor nucleici
1962	Francis H. Crick, James D. Watson, Maurice H.F. Wilkins	Structura moleculară a acizilor nucleici și semnificația ei pentru transferul de informație
1965	François Jacob, André Lwoff, Jacques Monod	Reglarea genetică a sintezei enzimelor
1966	Peyton Rous	Virusurile oncogene
1968	Robert W. Holley, Har Gobind Khorana, Marshall W. Nirenberg	Descifrarea codului genetic
1969	Max Delbrbrück, Alfred D. Hersey, Salvador Luria	Structura genetică și mecanismul replicării virusurilor
1974	Albert Claude, Christian de Duve, George E. Palade	Structura și organizarea celulară a celulei
1975	David Baltimore, Renato Dulbecco, Howard M. Temin	Interacțiunea dintre virusurile tumorale și ADN nuclear
1978	Werner Arber, Daniel Nathans, Hamilton O. Smith	Enzimele de restricție și aplicarea lor în genetica moleculară
1980	Baruj Bernacerraf, Jean Dausset, George D. Snell	Controlul genetic al răspunsului imun
1980 (chimie)	Paul Berg, Walter Gilbert, Frederick Sanger	Determinarea secvenței bazelor în ADN
1983	Barbara McClintock	Genele mobile (transposoni)
1985	Michael S. Brown, Joseph L.Goldstein	Receptorii celulari în hipercolesterolemia familială
1986	Stanley Cohen, Rita Levi-Montalcini	Factorii de creștere
1987	Susumu Tonegawa	Aspectele genetice ale anticorpilor
1989	Michael J. Bishop, Harold E. Varmus	Studiul oncogenelor
1993	Richard J. Roberts, Philip A. Sharp	Structura discontinuă a genelor
1993 (chimie)	Kary B. Mullis, Michael Smith	Metode de analiză a acizilor nucleici
1995	Edward Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Wieschaus	Controlul genetic al dezvoltării embrionare precoce
1999	Günter Blobel	Semnalele intrinseci ale proteinelor care guvernează transportul și localizarea lor celulară
2001	Leland H. Hartwell, Tim Hunt, Paul M. Nurse	Mecanismele de reglare a ciclului celular
2002	Sydney Brenner, Robert Horvitz, John Sulston	Reglarea genetică a dezvoltării organelor și moartea celulară programată
2006	Andrew Z. Fire, Craig C. Mello	Interferența ARN și represia genelor prin ARN bicatenar
2006 (chimie)	Roger D. Kornberg	Studiul bazelor moleculare ale transcripției la eucariote
2007	Mario R. Capecchi, Martin J. Evans, Oliver Smithies	Inactivarea unei gene specifice în celule stem embrionare de șoarece („knockout mice") pentru studiul funcției sale normale și anormale
2009	Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider, Jack W. Szostak	Telomerele cromozomilor și telomeraza
2009 (chimie)	Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz, Ada E. Yonath	Structura și funcția ribozomului

* Lista se referă la Premii Nobel în Fiziologie sau Medicină și cuprinde, în unii ani, laureați ai Premiului Nobel în Chimie

copil, adult) și deseori înainte de manifestarea clinică a bolii (presimptomatic). De asemenea, cu ajutorul unor sonde specifice, se pot detecta genomurile unor virusuri, bacterii și paraziți care infectează organismul uman. *Diagnosticul genotipic* devine astfel o nouă și eficace acțiune în medicina practică.

- Pe plan terapeutic tehnicile de ADN recombinat au dus la obținerea unor noi mijloace și soluții terapeutice. A început *fabricarea industrială a unor proteine umane cu valoare terapeutică* (insulină, interferon, hormon de creștere, eritropoietină, factor VIII, streptokinază, ș.a.) prin inserția unor gene umane în bacterii și cultivarea lor în bioreactoare. Au apărut noi soluții terapeutice, în care prin sinteza unor inhibitori ai transcripției genelor mutante sau a unor oligonucleotide anti-sens (complementare ADN sau ARNm) se încearcă blocarea funcționării genelor mutante sau a genomurilor exogene a unor

virusuri (de exemplu, HIV). A devenit operaţională (din 1991) şi *terapia genică*, în care prin fabricarea şi introducerea unor gene normale în celulele somatice ale unor bolnavi cu afecţiuni genetice grave se poate ameliora/corija efectul genelor mutante.

b) Proiectul genom uman

În anul 1990 s-a iniţiat **„Proiectul genom uman"** PGU) unul din cele mai ample şi ambiţioase pro-rame de cercetare ştiinţifică medicală internaţională 20 de centre din 6 ţări, reunite în Consorţiul inter-aţional pentru secvenţierea genomului uman – HGSC[9]). Obiectivul primar, pentru 15 ani, a fost *'eterminarea secvenţei nucleotidice complete a DN nuclear* (dintr-un set haploid de 22 autozomi, lus X şi Y) şi *identificarea, localizarea şi funcţia genelor ce alcătuiesc genomul uman.*

„O schiţă de lucru" a fost gata în iunie 2000 şi publicată în februarie 2001. Prima „versiune finisată", aproape completă[10] a genomului uman a fost anunţată la 14 aprilie 2003, cu doi ani mai devreme decât era planificat, *„inaugurând oficial era genomicii"*, ea a fost publicată în 2004 (IHGSC, Build 35). A urmat apoi resecvenţierea cu noi tehnici fiecărui cromozom, iar în 2007 secvenţa întregului enom uman a fost declarată „încheiată/terminată".

Dintre numeroasele informaţii descoperite de GU vom sublinia doar două elemente „cheie" estul datelor vor fi prezentate în capitolul 3):

- Există aproximativ 22.000 de gene ce codifică proteine (cifra exactă nu se cunoaşte încă, dar este cuprinsă între 20.000 şi 24.000 gene), mult mai puţine decât la alte specii mai simple, dar care produc (prin matisare alternativă) mult mai multe proteine (numărul proteinelor umane este 5-20 ori mai mare decât al genelor, fiind mult mai complexe „arhitectural" decât la organismele simple.
- Secvenţa genomului uman este identică la 99,9% dintre oameni (se spulberă definitiv ideea raselor umane), dar diferenţa de 0,1% face ca fiecare om să aibă o secvenţă unică de ADN. Variaţiile individuale („personalizate") ale structurii genomului au o contribuţie semnificativă la variabilitatea umană şi boală (riscul diferit la agresiunile mediului şi la bolile comune ale adultului), dar şi la eficienţa unor tratamente. De asemenea, variaţiile genomice – individuale şi etnice – ne pot furniza informaţii preţioase şi despre evoluţia şi răspândirea speciei umane.

PGU ridică însă noi şi numeroase probleme etice, sociale şi legale. Preocupările etice s-au comutat de la *autonomie*, ca ultim arbitru, spre *beneficiul comun şi consimţământul deschis*[11].

5. Era genomicii şi medicina genomică (2003→)

Era genomicii – cea *„...mai fundamentală etapă din istoria omenirii"* – este marcată de descifrarea structurii genomului uman şi va continua cu **adnotarea (genomica) structurală** – identificarea, localizarea şi structura tuturor genelor, inclusiv a elementelor reglatoare (*„lista părţii biologice"*) şi cu **adnotarea (genomica) funcţională** – înţelegerea expresiei, funcţiei biochimice şi biologice[12], reglării şi interacţiunilor tuturor genelor şi a ADN necodant.

Importanţa medicală a variaţiilor individuale în structura genomului au determinat iniţierea unor noi proiecte internaţionale pentru identificarea şi catalogarea variantelor la mii de persoane din populaţii diferite (*HapMap Project*, *Genome 1000*, precum şi a unor studii de asociaţie pentru a corela anumite variante genomice cu anumite boli comune (*Public Health Genomics*). În acest context este util să reamintim ceea ce spunea Sir William Osler: *„dacă n-ar exista variabilitate individuală medicina ar fi o ştiinţă şi nu o ARTĂ"*.

În contextul amplu al genomicii funcţionale, se dezvoltă **„biologia reţelelor"** – o abordare „sistemică" ce va permite descifrarea *reţelelor reglatorii* (gene, ARN) şi *funcţionale* (semnalizare, metabolice); „sistemele" au proprietăţi şi funcţii diferite faţă de elementele componente fiind ierarhizate pe diferite niveluri (celulă, organ, organism) şi dinamice (îşi pot modifica arhitectura în cursul proceselor biologice: dezvoltare, răspunsuri fiziologice, boli).

Finalizarea PGU este o etapă fundamentală în progresul medicinei şi cunoaşterea evoluţiei omului care *inaugurează era genomicii în medicină* şi sănătatea publică. Se trece de la *genetica medicală* – care studiază *gene izolate* şi efectele lor (boli genetice), la un număr relativ mic de pacienţi – la **medicina genomică** – care studiază funcţia şi interacţiunile *tuturor genelor* din genom asupra fenotipului, precum şi interacţiunile genomului cu mediul şi

9. International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC).
10. 92,3% din întregul genom (2,85 miliarde nucleotide), circa 99 % din genomul eucromatinic (ce conţine genele umane) al unui set haploid de cromozomi, cu o precizie de 99,99 % (o eroare la 100.000 de baze; au rămas nesecvenţiate 341 lacune (~228Mb) cu ADN înalt repetitiv foarte dificil de secvenţiat, cu metodele actuale.
11. Preocuparea pentru protecţia datelor individuale s-a finalizat în SUA prin *„Genetic Information Non-Discrimination Act"* (2008) care interzice folosirea informaţiei genetice în asigurările şi serviciile medicale.
12. În prezent se cunoaşte funcţia a circa jumătate din genele umane.

experiența personală, la *toți oamenii*. Medicina genomică reflectă nu numai *o modificare cantitativă* în abordare (de la o genă unică la multe gene), dar și *o modificare calitativă: „ce ne poate spune evaluarea întregului genom despre acest individ, în această situație și în acest moment"*. Medicina genomică este **o *medicină individualizată***, în esență *personalizată, predictivă și preventivă.*

În final subliniem că foarte recenta *abordare sistemică* din genomica funcțională, pentru descifrarea rețelelor funcționale și reglatorii, va permite înțelegerea profundă a mecanismelor bolilor umane, dezvoltarea unor markeri performanți pentru diagnosticul și prognosticul bolilor umane și noi tipuri de medicamente. Probabil că *„...medicina sistemelor va fi viitorul medicinei genomice și îngrijirilor medicale"* (Auffray, 2009).

D. Importanța geneticii în medicina modernă

În ultimele decenii, cunoștințele de genetică au devenit din ce în ce mai importante în teoria și practica medicală. Pentru orice persoană neavizată se poate pune firesc întrebarea: *„de ce genetica medicală are astăzi un rol major în teoria și practica medicală?"* Răspunsul este complex, dar edificator.

- Factorii genetici participă la edificarea structurilor și desfășurarea funcțiilor organismului; ei acționează în orice organ și în fiecare etapă a vieții, la orice vârstă; astfel genetica oferă medicinei un concept unificator, integrator.
- Cunoștințele despre rolul major al mutațiilor în producerea bolilor sau vulnerabilității la boală au progresat rapid și masiv.
- Ponderea bolilor genetice, atât la copil, cât și la adult, a crescut (și va crește) prin scăderea prevalenței bolilor infecțioase și nutriționale (mai vizibilă în țările dezvoltate), devenind o problemă importantă de sănătate publică.
- Solicitările de evaluare a riscului genetic și de testare genetică, prenatală sau postnatală, au crescut, devenind frecvente în practica medicală.
- Genomica a deschis drumul spre o medicină personalizată și predictivă, cu largi aplicații în toate specialitățile medicale.

Sintetizând aceste date, se poate afirma că *medicina actuală se bazează în mare măsură pe genetică,* devenind o *medicină moleculară* sau *genomică*. În aceste condiții, *nici un medic nu mai poate ignora bazele geneticii medicale, iar studentul în medicină este obligat să și le însușească.* El trebuie să fie pregătit pentru a integra cunoștințele de genetică în aria medicinei pe care o va practica. Genetica „înarmează" viitorul medic cu principiile necesare înțelegerii viitorului medicinei.

1. Bolile genetice și impactul lor clinic și social

Bolile genetice erau considerate rarități cu care practicianul se întâlnea întâmplător în cursul activității sale. Pe măsură ce tehnologiile de studiu și cunoștințele de genetică au progresat, iar frecvența bolilor negenetice (cauzate de malnutriție, infecții ș.a.) s-a diminuat spectaculos, a devenit evident impactul masiv al patologiei genetice în practica medicinei moderne.

Bolile genetice sunt numeroase. Se cunosc peste 10.000 de boli determinate sau condiționate genetic; ele au o mare diversitate, se manifestă la orice vârstă, la orice sistem de organe și, de aceea, se regăsesc în aproape toate specialitățile medicale. *Bolile genetice sunt frecvente; ele afectează cel puțin 5-8% dintre nou-născuți* (1 din 20) și probabil 30-40 % din indivizi în tot cursul vieții (tabelul 1.2).

Bolile genetice au o contribuție majoră la mortalitatea infantilă și morbiditate. Acum mai puțin de un secol, bolile produse de cauze negenetice (malnutriție, infecții, condiții insalubre etc.) produceau majoritatea deceselor la copil. În secolul XX, sănătatea publică s-a îmbunătățit și, ca rezultat, mortalitatea infantilă s-a redus, iar bolile genetice au devenit o cauză majoră a deceselor la copil. De exemplu, în Marea Britanie, decesele prin boli genetice erau 16,5% în 1914 și 50% în 1976. 30-50% dintre internările de astăzi în spitalele de copii sunt determinate de afecțiuni genetice sau anomalii congenitale; circa 10% dintre internările de astăzi în spitalele de adulți sunt produse de boli genetice sau condiționate genetic. Circa 50% dintre avorturile spontane din trimestrul I de sarcină sunt produse de anomalii cromozomiale. Aproximativ 2-3% dintre nou-născuți au o anomalie congenitală majoră, deseori produsă de factori genetici; alți 2% dintre nou-născuți au o anomalie cromozomială sau o boală monogenică.

Bolile genetice sunt boli cronice care realizează frecvent un *handicap* fizic, senzorial, motor sau mental. Bolile genetice produc peste 50% dintre cazurile severe de retard mental, de surditate sau cecitate la copil. Îngrijirea pacienților cu boli genetice implică *cheltuieli importante*.

BCU "IULIU HAȚIEGANU" UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 1.2. Incidenţa[13] bolilor genetice
(modificat după Connor & Ferguson-Smith, 1997 şi Jorde *et al.*, 2000)

Tipuri majore de boli genetice	Număr de subtipuri	Incidenţa la 1.000 nou-născuţi vii
Boli cromozomiale (de exemplu: sindromul Down)	> 600	6-9
Boli monogenice (mendeliene)		
- Autozomal dominante (de exemplu, boala polichistică renală a adultului = ADPKD;	5.623*	24
- Autozomal recesive (de exemplu, fibroza chistică)		20
- Legate de X (exemplu, hemofilia; daltonismul)	476*	2
		2
Boli mitocondriale	26	Rare
Boli multifactoriale (debut înainte de 25 ani)		
- Malformaţii congenitale majore (de exemplu, spina bifida, DSV, despicăturile labio-maxilo-palatine)	>50	20-50
- Boli comune ale adultului (de exemplu, hipertensiunea arterială, diabetul zaharat, boala ulceroasă, schizofrenia)	>50	
Total (înainte de 25 ani)		**50-83**
Boli genetice ale celulelor somatice[#]	>100	250
Total		300-383

* După OMIM (1998).
[#] Acest tip de boli apar după naştere, la circa 25% dintre adulţi.

Se poate conchide, fără rezerve, că *bolile genetice reprezintă o problemă majoră de sănătate publică*, ce impune acţiuni concrete şi eficace de agnostic şi un **Program naţional de profilaxie a olilor genetice**, bazat pe sfat genetic, *screening* şi agnostic prenatal, *screening* neonatal (pentru boli cvente şi tratabile), registre regionale sau naţio- le şi diagnosticul presimptomatic în familiile cu c genetic crescut.

Implicaţiile geneticii medicale în practica clinică

Genetica medicală – ca parte a geneticii umane – a devenit o specialitate clinică distinctă care se ocupă de diagnosticul şi îngrijirea pacienţilor cu boli genetice, precum şi de familiile lor prin: sfat genetic, diagnostic prenatal, *screening* neonatal sau diagnostic presimptomatic. În felul acesta genetica este implicată în asigurarea *„sănătăţii de-a lungul generaţiilor"*. Ponderea serviciilor de genetică medicală în asistenţa medicală a populaţiei a devenit importantă şi nu mai poate fi ignorată. *„Copiii cu nevoi speciale sunt victime ale destinului şi este păcat să fie şi victime ale indiferenţei sau ignoranţei noastre"* (J.F.Kenedy).

În fiecare an se nasc în România circa 7.200 copii cu anomalii congenitale, iar 12.000 vor fi afectaţi de diferite boli genetice înainte de 25 de ani. Deci, circa 20.000 de copii şi familiile lor (în care şi alte persoane au un risc genetic) au nevoie anual de diagnostic, explorări şi sfat genetic; aceasta impune, cu necesitate dezvoltarea **Centrelor de genetică** medicală – unităţi integrate de clinică şi laborator – care se ocupă cu diagnosticul şi explorarea pacienţilor cu anomalii congenitale şi boli genetice precum şi a familiilor lor, confruntate cu riscul de recurenţă a acestor afecţiuni.

Serviciile de genetică medicală şi medicii geneticieni realizează, ca şi alţi specialişti, *diagnosticul, explorările şi îngrijirea pacienţilor* care au o afecţiune în care factorii genetici au o contribuţie semnificativă. Activităţile lor multiple au însă câteva particularităţi determinate de specificul **bolilor genetice**[14], care *afectează orice organ, la orice vârstă şi sunt produse de mutaţii, ce pot fi ereditare.*

- *Varietatea clinică* – determinată de afectarea unor ţesuturi şi organe diferite – este importantă: anomalii congenitale şi sindroame plurimalformative, tulburări de creştere şi dezvoltare, displazii scheletice, boli ale ţesutului conjunctiv sau neuromusculare, retard mental sau afectări senzoriale (cecitate, surditate), boli metabolice, tulburări de reproducere (sterilitate, avorturi spontane repetate), cancere sau boli neurodegenerative etc. Această mare diversitate clinică solicită medicului genetician cunoştinţe sintetice,

13. *Incidenţa* se referă la *rata* cu care se produc cazuri noi. *Prevalenţa* se referă la proporţia unui grup afectat la un anumit moment (în cazul bolilor genetice prevalenţa este mai mică decât incidenţa, fie din cauza speranţei de viaţă mai reduse, fie din cauza debutului bolii la vârste mai tardive). *Frecvenţa* este un termen nespecific, folosit uneori sinonim pentru incidenţă.
14. Toate problemele vor fi prezentate pe larg în capitolul 9.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

dar solide din diferite domenii de patologie („*medicii geneticieni sunt probabil ultimii generaliști adevărați*") și o colaborare strânsă cu specialiștii de „organ". La fel de valabil este și „reversul" situației: medicii specialiști (în special în pediatrie, neurologie, endocrinologie, obstetrică, oftalmologie, dermatologie, oncologie, ș.a.), confruntați cu patologia genetică a domeniului lor trebuie să aibă cunoștințe de bază în genetica medicală și, mai ales, un mod de *„abordare genetică în relația medic – pacient – familie"*.

- Numeroase boli genetice debutează și se manifestă *la copil* motiv pentru care patologia genetică este considerată în esență „pediatrică". Dar bolile genetice interesează și *patologia adultului,* mai ales prin tulburările de reproducere, bolile genetice cu debut tardiv (de exemplu, hipercolesterolemia familială sau ADPKD) sau bolile comune, bolile neurodegenerative și cancerul. De altfel, *screeningul* și diagnosticul genetic prenatal sunt cele mai frecvente acțiuni medicale la adultul tânăr, în perioada reproductivă.
- *Testele genetice* – moleculare, metabolice sau cromozomiale – pun *diagnosticul de certitudine* într-un număr din ce în ce mai mare de boli, identificând mutațiile sau efectul lor primar, proteinele anormale. Mai mult, în anumite situații testele genetice pot pune un *diagnostic presimptomatic sau prenatal* de boală genetică. De asemenea, cu ajutorul unor sonde specifice, se pot detecta genomurile unor virusuri, bacterii și paraziți care infectează organismul uman. Diagnosticul genotipic devine astfel o nouă și eficace acțiune în medicina practică; de aceea cunoașterea indicațiilor sau interpretarea testelor genetice sunt „obligatorii" pentru orice medic practician.
- Deoarece mutațiile pot fi transmise ereditar, rudele bolnavilor au *un risc genetic* de a moșteni mutația cauzatoare de boală. De aceea, caracteristic pentru genetica medicală este *sfatul genetic*, un proces de comunicare prin care pacienții și/sau rudele lor cu risc de boală ereditară sunt informați asupra consecințelor bolii, probabilității apariției sau transmiterii ei în familie și căilor prin care aceasta poate fi ameliorată sau prevenită. În genetica medicală *unitatea de acțiune este familia.*
- *Profilaxia bolilor genetice* se poate realiza prin screening *genetic populațional, prenatal sau postnatal* sau prin *screening* familial. Scopul acestor acțiuni este recunoașterea precoce a unei boli sau genotip anormal astfel ca printr-o intervenție precoce adecvată, procesele patogenice să poată fi prevenite sau persoanele implicate să poată lua o decizie informată.
- Întrucât bolile genetice sunt produse de modificări ale cromozomilor sau genelor, în mod obișnuit *nu există tratamente* care să corecteze alterările genetice în fiecare celulă a corpului. Totuși, în multe afecțiuni genetice există posibilități de tratament patogenic sau simptomatic, iar recent s-a dezvoltat terapia de modulare a expresiei genice și *terapia genică*, prin introducerea unei gene normale în celulele somatice ale pacienților cu mutații se poate ameliora/corija efectul genelor mutante.

Toate aceste date pledează convingător pentru rolul major al geneticii medicale în medicina actuală. O recunoaștere recentă a impactului bolilor genetice asupra stării de sănătate este raportul (comunicarea) Comisiei europene pentru sănătate către Parlamentul European și Consiliul Europei intitulat **„Bolile rare – o provocare pentru Europa"** (11 noiembrie 2008). În acest raport se subliniază că bolile rare, fiecare cu o prevalență sub 1:2000, sunt afecțiuni diverse (majoritatea fiind boli genetice[15]) și complexe care pun adesea în pericol viața sau provoacă o invaliditate cronică. Deoarece sunt numeroase (peste 5.000), ele afectează 6-8% din populație, într-un anumit moment al vieții (circa 30 de milioane în UE și aproape un milion în România). Cunoștințele și expertiza medicilor sunt limitate sau insuficiente și de aceea bolile rare nu sunt recunoscute la timp sau sunt neglijate (diagnostic întârziat sau greșit, tratamente inadecvate), fapt ce determină reducerea calității vieții și neîncredere în sistem. Specialiștii sunt puțini, iar accesul bolnavilor la servicii de specialitate (puține și diferite calitativ) este deseori dificil, limitat și inechitabil; lipsa unei identificări oficiale duce la nealocarea de fonduri și resurse suficiente fapt ce creează un „cerc vicios".

Abordarea bolilor rare necesită o strategie generală, bazată pe eforturi combinate, pentru ameliorarea accesului și egalității pacienților la profilaxie, diagnostic și tratament. Numărul scăzut de pacienți și nevoia de resurse fac ca orice demers să nu fie eficient decât la nivel european, bazat pe valorile cheie pe care este construită UE: *cooperare și solidaritate.* Experții care au realizat acest raport au făcut o *Propunere de recomandare* pentru Consiliul Europei intitulată **„ Privind o acțiune europeană în domeniul bolilor rare"** – care prevede: (1) îmbunătățirea recunoașterii

15. Peste 80% din bolile rare sunt boli genetice, restul fiind cancere rare, malformații congenitale, boli autoimune, toxice și infecțioase.

şi vizibilităţii bolilor rare (diseminarea cunoştinţelor, reţele de informare, ghiduri de bună practică etc.); (2) sprijinirea politicilor naţionale privind bolile rare în statele membre, care vor trebui să-şi creeze Centre naţionale de referinţă şi competenţe şi să elaboreze (până în 2013) un *Plan naţional de combatere a bolilor rare*, susţinut financiar în mod adecvat; 3) dezvoltarea cooperării, coordonării şi reglementărilor privind bolile rare la nivel european (inclusiv integrarea Centrelor naţionale într-o reţea europeană. Această *recomandare a fost adoptată de Consiliul Europei la 9 iunie 2009*, creând premizele schimbării radicale a abordării bolilor rare şi deci a bolilor genetice în statele membre, inclusiv în România.

3. Abordarea genetică devine o componentă de rutină în relaţia medic – pacient

Genetica devine nu numai o parte integrantă a medicinii moderne, ci şi o componentă de rutină a îngrijirii bolnavilor şi familiilor lor. Se produce astfel *o modificare importantă în relaţia* „medic – pacient".

Practica medicală se bazează în esenţă pe îngrijirea unor pacienţi care au o anumită suferinţă. Medicul implicat în această acţiune trebuie să obţină date pentru a răspunde la două întrebări specifice, esenţiale:

(1) *ce are pacientul?*

(2) *ce se poate face pentru pacient?*

Aceste întrebări exprimă în principiu elementele majore, clasice, ale *relaţiei medic – bolnav*: diagnosticul şi tratamentul bolii, care constituie reperele concepţiei esenţialiste despre boală.

Dezvoltarea remarcabilă a geneticii medicale în ultimii 30 de ani, atât în planul informaţiilor, cât şi al posibilităţilor practice de evaluare a pacienţilor, a adăugat alte două întrebări care, evident, lărgesc sfera problemelor şi raporturilor dintre medic şi pacient:

(3) *de ce acest pacient a făcut această boală, acum?*

(4) *ce posibilităţi există pentru a preveni sau reduce în viitor manifestarea bolii – la pacient şi/sau familia sa?*

Prin a treia întrebare se urmăreşte *stabilirea etiopatogeniei* afecţiunii. Genetica umană a demonstrat că *fiecare om este unic* pentru că are o anumită structură genetică şi biologică care explică diferenţele individuale în capacitatea de apărare sau metabolizare a substanţelor şi, deci, în vulnerabilitatea organismului la agresiunile mediului. De asemeni, a devenit evident că aproape orice boală este rezultatul interacţiunii factorilor genetici cu factorii de mediu. Ultima întrebare vizează *prognosticul şi profilaxia* complicaţiilor bolii la pacient precum şi riscul de apariţie a afecţiunii la alţi membri ai familiei. Posibilitatea transmiterii genelor mutante sau a genelor de susceptibilitate la rudele bolnavului determină implicarea medicului în viaţa familiei, pentru a evita apariţia sau recurenţa bolii la alte persoane.

A devenit evident că în relaţia sa cu bolnavul medicul trebuie să ţină cont de toate aceste elemente noi, fundamentate de genetică. În felul acesta relaţia medic-pacient devine mai complexă, căpătând o nouă dimensiune reprezentată de **abordarea genetică** (figura 1.5). Ea a devenit o componentă de rutină a îngrijirii bolnavilor şi a prevenirii îmbolnăvirilor.

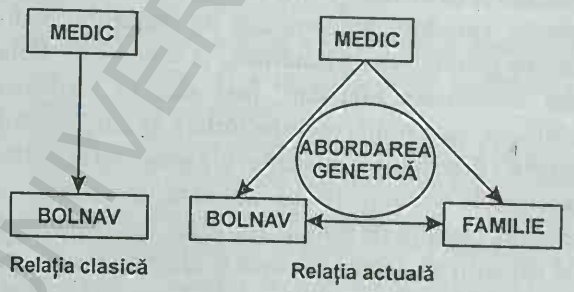


Figura 1.5. Relaţia dintre medic şi bolnav

Abordarea genetică se bazează pe trei principii majore, ce determină acţiuni distincte:

- pacientul are o anumită individualitate biologică,
- în marea majoritate a bolilor intervin factori genetici, determinanţi sau favorizanţi,
- genele mutante se transmit la alte persoane din familie.

a) Individualitatea biologică

Individualitatea biologică a fiecărei persoane este determinată de structura genetică unică, matricea dezvoltării sale (sex, vârstă, gândire, comportament), mediul în care s-a dezvoltat şi experienţa sa de viaţă (educaţie, ocupaţie, status socioeconomic, obiceiuri, alimentaţie etc.) (vezi subcapitolul 1.B.1). Această *unicitate bio-psiho-socială* poate explica:

- *răspunsul specific la agresiunile* factorilor de mediu sau *predispoziţia genetică* la anumite boli comune; în funcţie de structura şi eficienţa sistemelor ce intervin în menţinerea homeostaziei, fiecare om este mai rezistent sau mai vulnerabil la anumite agresiuni ale factorilor biologici, chimici sau fizici din mediu; cu alte cuvinte *„suntem inegali în faţa bolii"*;
- *manifestările variabile şi gravitatea bolii*, au fost recunoscute de mult timp şi sintetizate în celebrul aforism *„nu există boli ci numai*

bolnavi"; explicaţiile acestor fenomene au fost denumite „constituţie" sau „teren", dar în final reprezintă consecinţele individualităţii biologice, determinată în primul rând de gene şi apoi de mediu;

- *răspunsul particular la tratament* al fiecărui bolnav, determinat de capacitatea de metabolizare şi eliminare a compuşilor chimici; la bolnavi cu aceeaşi afecţiune un medicament administrat în aceeaşi doză poate avea efecte diferite: la unii va fi terapeutic, la alţii nu va produce vindecarea, iar la unele persoane va da reacţii adverse; tratamentele şi dozele medicamentelor vor fi adaptate la fiecare bolnav.

b). Natura genetică a bolii

În funcţie de ponderea factorilor etiologici – genetici şi de mediu – bolile umane sunt *determinate genetic* (produse predominant de mutaţii), *condiţionate genetic* (multifactoriale) şi *negenetice*. Cele mai numeroase afecţiuni, mai ales în medicina adultului, sunt bolile multifactoriale, în care factorii genetici determină o *predispoziţie genetică* la boală; persoanele vulnerabile se îmbolnăvesc numai în anumite condiţii de mediu. Toţi clinicienii trebuie să fie capabili să determine dacă o anumită boală este genetică, parţial (posibil) genetică sau negenetică. Ei trebuie *să înţeleagă* natura bolii şi consecinţele sale şi să fie capabili *să discute* aceste informaţii cu bolnavul şi familia lui şi să-i îndrume, dacă este necesar, la alţi specialişti.

Stabilirea naturii genetice a unei boli nu este o acţiune simplă (vezi capitolul 10); ca şi în alte domenii ale medicinei, aceasta poate implica mai mulţi specialişti (inclusiv geneticieni) precum şi explorări genetice. Dar orice practician, de la medicul de familie la specialist, trebuie să ştie cum să procedeze şi mai ales să fie convins că *stabilirea naturii bolii este decisivă* pentru determinarea evoluţiei (istoriei naturale) şi prognosticului bolii, îngrijirea bolnavului, evaluarea riscului genetic de recurenţă în familia sa precum şi a posibilităţilor de reducere a acestui risc. În aceste condiţii el *nu va ignora anamneza familială* şi va şti ce explorări genetice să recomande.

Medicului practician trebuie să-i fie familiare o serie de *concepte genetice:* pleiotropie, expresivitate variabilă, penetranţă, heterogenitate genetică, fenocopii, moduri de transmitere şi riscuri genetice. Aceasta nu înseamnă nicidecum că practicianul se va substitui specialistului în genetică medicală ci numai că el va realiza o „medicină de bună calitate" aplicând principiile geneticii sau, pe scurt, „o medicină genetică".

După stabilirea diagnosticului clinic şi etiologic este absolut necesară *informarea pacientului* sau a familiei sale (în cazul unui copil sau al unei persoane cu handicap) asupra naturii bolii, evoluţiei şi consecinţelor ei. Această acţiune este importantă, plină de responsabilitate; ea necesită nu numai dibăcie de comunicare, ci şi cunoştinţe precise despre genetica bolii respective. Orice medic trebuie să fie conştient de necesitatea unei pregătiri fundamentale prealabile, care îi va permite, cu ajutorul unei biblioteci şi a internetului, să capete informaţiile necesare procesului de informare a pacientului. Apoi, el se va implica – direct sau indirect – în informarea şi evaluarea altor membri ai familiei bolnavului.

c). Familia ca unitate de acţiune

Abordarea genetică este o atitudine care reflectă obligaţia medicului *de a asista nu numai bolnavul, ci şi familia sa...* pentru a evita apariţia sau recurenţa bolii în familie... Prin aplicarea curentă a acestei atitudini, clinicianul poate contribui efectiv la *prevenirea bolilor genetice.* Această acţiune derivă din esenţa eredităţii ce implică transmiterea genelor mutante la alţi membri ai familiei. Medicul poate identifica alte cazuri nediagnosticate (deseori oligosimptomatice), precum şi persoane sănătoase, dar cu risc de a fi moştenit gena mutantă.

În funcţie de tipul de boală – monogenică, recesivă sau dominantă (eventual cu debut mai tardiv) sau multifactorială – se va acorda un sfat genetic adecvat şi se va recurge eventual la un diagnostic presimptomatic/prenatal (vezi capitolul 10). Chiar dacă medicul de familie nu poate să îndeplinească toate sarcinile ce decurg din această atitudine, el este obligat să se asigure că familia le cunoaşte şi, prin trimiterea la alţi specialişti, familia primeşte îngrijirea competentă necesară.

A devenit evident că *„nu există boli ci numai... familii de bolnavi"*, iar familia este o unitate de acţiune. În acest context, în afară de cunoştinţe, dublate de abilitatea de comunicare, medicul trebuie să ţină cont de implicaţiile psihologice posibile şi să aplice principiile bioeticii: respectul confidenţialităţii, consimţământul informat etc.

Abordarea genetică presupune *informarea pacientului* asupra: a) modului său particular de a face boala şi răspunde la tratament; b) componentei genetice a bolii; c) caracterului ei familial. La această acţiune se adaugă *implicarea medicului în familia bolnavului,* pentru diagnosticul unor cazuri noi de boală sau identificarea unor persoane cu risc, care trebuie sfătuite şi ajutate corespunzător.

În esenţă, abordarea genetică în medicină, înţelegerea şi aplicarea în practică a celorlalte descoperiri ale geneticii şi medicinei moleculare presupune *o cultură şi... o concepţie (gândire) genetică*, care trebuie însuşite. Pentru medicul practician această acţiune pare dificilă, dar toate lucrurile noi sunt

dificile; abordarea lor merită făcută atunci când beneficiile sunt reale şi importante.

Volumul şi complexitatea informaţiilor genetice au crescut substanţial şi nu pot fi utilizate fără a recurge la sistemele informatice de stocare, regăsire i utilizare datelor (programe informatice, Internet) vezi Caseta 1.1). Valoarea şi utilitatea practică a atelor genetice (în special în individualizarea tratamentului sau profilaxiei) nu mai pot fi ignorate şi bligă pe clinicieni să folosească aceste informaţii entru a-şi asista pacienţii. Aceasta presupune nu umai cunoaşterea principiilor de bază ale geneticii edicale ci şi disponibilitate pentru un sistem de ducaţie medicală continuă, care nu poate fi ignorat e nimeni.

4. Perspectivele medicinei genomice

Finalizarea PGU a inaugurat *era genomicii* în medicină şi sănătatea publică[16]. Aşa cum am mai spus, **medicina genomică** studiază funcţiile şi interacţiunile *tuturor genelor din genom* şi interacţiunile genomului cu mediu asupra fenotipului normal şi tologic, în starea de sănătate şi boală *la toţi oamenii*. Medicina genomică va fi *o medicină individualizată* care va schimba cu certitudine practica edicinei, furnizând îngrijiri medicale adaptate la cesităţile individului.

„Testele genomice vor fi piatra de temelie a regii medicini" (Francis Collins, 2003) deoarece lizarea *„profilului genomic personal"* şi evaluarea modificărilor cantitative ale ARNm (transcriptom) sau profilului expresiei proteinelor (proteom) vor ameliora deciziile medicale şi vor maximiza beneficiile tuturor acţiunilor de îngrijire a sănătăţii.

- În iulie 2000, preşedintele SUA Bill Clinton, anunţând momentul apropiatei finalizări a PGU, spunea: *„...cu aceste noi şi profunde cunoştinţe, umanitatea este pe cale să câştige noi puteri de a vindeca; ştiinţa genomicii va avea un impact real în viaţa noastră a tuturor şi chiar mai mult în viaţa copiilor noştri"*.
- Referindu-se la aplicaţiile genomicii în sănătatea publică un comitet de experţi a OMS (2002) concluziona: *„ ...este clar că genomica are un potenţial extraordinar de îmbunătăţire globală a sănătăţii... informaţiile furnizate de genomică vor furniza beneficii majore în prevenţia diagnosticul şi managementul bolilor transmisibile şi genetice precum şi a bolilor comune, inclusiv boli cardiovasculare, cancer, diabet sau boli psihice"*.

Beneficiile genomicii pentru medicina clinică şi sănătatea publică sunt potenţial enorme. Datele genomice ale individului vor permite:

- elucidarea patogeniei moleculare a bolilor şi a rolului variaţiilor genomice în determinarea bolilor comune. Aceasta va determina introducerea unei *noi taxonomii moleculare* a bolilor umane, concomitent cu „comutarea" de la orientarea fenotipică şi morfologică (patologia de organ) la orientarea genotipică şi moleculară a bolilor produse de alterarea unor anumite căi celulare şi va duce la identificarea unor noi ţinte terapeutice la nivel de gene şi/sau proteine;
- detectarea precoce a bolii şi diagnosticul ei specific („profilul molecular");
- prevederea mai precisă a progresiei şi severităţii bolii, precum şi a prognosticului pacientului (mai ales în cancere);
- alegerea terapiei optime (tip de agent farmacologic, doză) pentru individ, predicţia unor efecte adverse la medicamente şi prevenirea lor, monitorizarea răspunsului la tratament a pacientului; aplicând principiul terapiei personalizate (*„un tratament corect pentru un anumit pacient la un anumit moment"*) *farmacogenomica* va deveni elementul principal în producerea şi prescrierea medicamentelor;
- stabilirea riscului (predispoziţiei/susceptibilităţii) individuale la bolile comune, pe baza analizei genomului personal, deschide calea unei predicţii personalizate şi prevenţii individualizate;
- îmbunătăţirea sănătăţii publice şi prevenţia bolilor cronice (*„genomica sănătăţii publice"*), inclusiv a celor produse de infecţii şi alţi factori de mediu (*„nutrigenomică, toxigenomică"*).

Rezultatele aplicării genomicii în medicină nu vor fi aşa curând relevante clinic. *„...publicarea schiţei GU nu înseamnă că practica medicală va fi brusc şi radical schimbată, dar, cu siguranţă, în următoarele decenii medicina genomică va transforma profund medicina clinică"* (Varmus, 2002). Transformările potenţiale ale practicii clinice se vor face treptat, vor fi lente, dar profunde. Vom traversa *o perioadă de tranziţie* ce implică trei categorii de acţiuni:

16. Autorii vă recomandă seria de articole destinate prezentării şi promovării medicinii genomice, publicate de prestigioasa revistă *New England Journal of Medecine* (www.nejm.org) în perioada 2002-2003, începută cu „Genomic medecine – a primer" (noiembrie 2002) şi încheiată cu editorialul „Welcome to the genomic era" – în septembrie 2003. În mai 2010 aceiaşi revistă începe o nouă serie de articole dedicată medicinii genomice cu prezentarea „Genomic medicine – an updated primer" (Feero W.G.).

(1) *îmbunătățirea „trainingului" medical*; să fim pregătiți să înțelegem și să aplicăm medicina genomică: *„...în stadiul actual avem nevoie de cunoștințe, vocabular și, mai ales, de un concept larg despre rolul genomicii pentru a evita riscul de a nu înțelege medicina viitoare"*; în educația medicală trebuie introdus un set nou de cunoștințe, aptitudini și atitudini privind genomica, pentru ca viitoarele generații de medici practicieni să poată interpreta și aplica rezultatele testelor genetice în clinică;

(2) *schimbarea treptată a „managementului" medical și gândirii clinice*: în medicina clasică pe primul plan este BOALA, în medicina genomică important este BOLNAVUL (*medicina personalizată*); se va trece, treptat, de la diagnostic și tratament la predicție și profilaxie individualizată – bazată pe susceptibilitățile individuale, iar *„...păstrarea sănătății va deveni mai importantă decât tratarea bolii"*.

(3) *adaptarea infrastructurii medicale* pentru a asigura efectuare determinărilor genomice (mai rapid și la un preț accesibil) și utilizarea largă a bioinformaticii, necesară colectării și interpretării datelor pentru fiecare pacient; va fi nevoie de o nouă generație de tehnologi și consilieri în genomică.

Progresele genomicii vor schimba practica medicinei, furnizând îngrijiri medicale individualizate, adaptate la necesitățile individului; medicina genomică va fi o medicină **prospectivă, predictivă, personalizată, preventivă și participativă** (5 P).

CASETA 1.1.

Genetica umană pe Internet

INTERNETUL este un sistem internațional amplu care leagă între ele computerele individuale și rețelele locale din universități, laboratoarele de cercetări, organizațiile guvernamentale sau comerciale. World Wide Web (www) este o modalitate de folosire a internetului cu ajutorul unui program web browser. Web folosește documente hypertext sau http (de la hypertext transmission protocol), care arată ca un text obișnuit (ce poate fi citit, editat, stocat etc.), dar unele cuvinte sau cadre (boxes) sunt subliniate printr-o culoare (albastră); acestea sunt legăturile (links) de acces la alte documente. Făcând click pe o astfel de legătură se poate accesa un alt computer, la mii de kilometri distanță.

Fiecare document web are un cod propriu numit uniform resource locator (URL) sub forma http:// www.numele serverului. De exemplu URL pentru serverul www de la The National Center for Biotechnology Information este http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ iar URL pentru European Bioinformatics Institute este http://www.ebi.ac.uk/ După ce se scrie adresa, web browserul computerului deschide Home Page din care prin cadrele de legătură se pot accesa alte pagini web.

Adresele diferitor baze de date se pot schimba. Dacă una din adresele cunoscute nu funcționează sau dacă nu știm adresa completă trebuie să o căutăm, plecând de la un punct start, folosind „o mașină de căutare" de tipul Google: http://www.google.com în care tastăm denumirea site-ului (de exemplu, OMIN sau Orphanet). În același mod se pot căuta documente cu un subiect specific, de exemplu despre o genă, o componentă moleculară, o boală genetică și chiar o revistă de specialitate. De la acest punct de start se pot găsi legăturile către diferite baze de date, generale sau specifice. Desigur aceste date elementare sunt inutile pentru un „internaut" familiarizat cu utilizarea internetului.

Adresele cele mai folosite în genetica umană și medicală pot fi grupate pe anumite categorii pentru a facilita informarea/studiul bazate pe internet; acest lucru este util la început deoarece fiecare utilizator își va crea propriul său repertoriu.

***Website-urile generale** sunt utile ca punct de plecare deoarece pe lângă informații au numeroase legături cu alte site-uri specifice. Vom menționa la început The National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) și European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/) și ne vom referi la câteva alte site-uri care ni se par foarte utile.*

- ***GeneTests** (www.genetest.org) – este un site al National Institute of Health (USA) care are obiectivul de a integra serviciile de genetică în îngrijirea pacienților pentru întreaga comunitate medicală internațională. Oferă date despre cinci domenii: bolile genetice (GeneReview) – descrierea, diagnosticul și îngrijirea a peste 500 de afecțiuni frecvente; testarea genetică pentru boli ereditare (GeneTests Laboratory Directory) – disponibilă în laboratoare din întreaga lume; servicii clinice de diagnostic și sfat genetic prenatal și postnatal (GeneTests Clinic Directory); legături către baze de date și alte informații genetice (Resources); materiale educaționale.*

- ***OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man*** *(www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim) – este un registru descriptiv al interacţiunilor genotip-fenotip sau, altfel spus, un catalog al caracterelor ereditare normale sau anormale şi genelor care le produc. Va fi descris pe larg în capitolul 6 (caseta 6.3).*
- ***Orphanet*** *(www.oepha.net)- un site european foarte apreciat deoarece furnizează numeroase informaţii şi servicii în bolile rare (majoritatea lor fiind genetice) pentru profesionişti, pacienţi cercetători.*
- ***Genetic Interest Group*** *(www.gig.org.uk) – prezintă informaţii despre organizaţiile care sprijină persoanele afectate cu anumite boli genetice şi date actualizate privind patogenia, tratamentul şi managementul acestor afecţiuni.*

Website-urile educaţionale *sunt utile atât pentru medicii – care vor sa afle mai multe date, prezentate sintetic, despre structura şi funcţiile materialului genetic precum şi despre diagnosticul bolilor genetice – cât şi pentru „educatori". Menţionăm site-urile câtorva universităţi: www.ncc.gmu.edu; www.kumc.edu; www.dnalc.org.*

Website-urile de genetică moleculară şi genom uman *– sunt utile profesioniştilor şi cercetătorilor care vor să afle informaţii despre gene şi genomul uman. Vom reveni în diferite capitole cu date specifice, dar este util să amintim aici câteva site-uri de referinţă:*

- ***Genom Database*** *(www.gdb.org) – o enciclopedie a stadiului actual al cunoştinţelor despre genomul uman.*
- ***Ensemble Genome Browser*** *(www.ensembl.org),* ***UCSC Genome Bioinformatics*** *al Universităţii California din Santa Cruz (www.genome.ucsc.edu) şi* ***Human Genome Organization*** *(www.hugo-international.org) – care furnizează informaţii actualizate permanent despre studiul genomului uman şi altor organisme.*
- ***Entrez Gene*** *(www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) furnizează informaţii despre gene specifice (nume, secvenţe, funcţii, interacţiuni, numele fenotipurilor / bolilor asociate cu diferitele ei variante, publicaţii) şi oferă legături către toate bazele de date specializate.*
- ***Human Gene Mutation Database*** *(www.hgmd.cf.ac.uk) – o bază de date a tuturor mutaţiilor în genele umane raportate până în prezent.*

Website-urile de genetică clinică. *Pe lângă site-urile GeneTest, OMIM, Orphanet menţionate mai sus există site-uri specializate pe anumite categorii de boli genetice precum baze de date clinice utile pentru diagnostic pe baza semnelor şi simptomelor pacientului.*

- ***London Medical Database*** *(www.lmdatabsase.com) – include informaţii preţioase privind sindroamele dismorfologice, bolile genetice neurologice şi oftalmologice.*
- ***POSSUM*** *(www.possum.net.au) – dedicat sindroamelor plurimalformative.*
- ***Human Cytogenetic Database*** *(www.forschungsporta.ch.unizh) – un catalog al peste 1.200 de anomalii cromozomiale*
- ***Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology – conţine informaţii genetice,*** *citogenetice şi clinice despre cancere şi bolile cu predispoziţie la cancer (www.atlasgeneticsoncology.org).*
- ***Cytogenetic resources:*** *http://www.kumc.edu/prof/cytogene.html prezintă o legătură foarte utilă cu multiple site-uri, inclusiv: Cytogenetic Images Index, Gene Map of human chromosomes, Human Cytogenetics Database, Chromosome Databases, Karyotypes of normal and abnormal chromosomes.*
- ***Decipher – DatabasE of Chromosme Imbalance and Phenotype in Human using Ensemble Resources*** *(http://decipher.sanger.ac.uk) – conţine descrierea clinică şi moleculară a tuturor rearanjările cromozomiale (microdeleţii, microduplicaţii, translocaţii) definite în contextul lor genomic.*
- ***eMedicine şi Medscape*** *(www.medscape.com) includ site-uri ce vizează toate specialităţile medicale, prezentând sinteze la zi şi ultimele informaţii publicate despre patologia umană, inclusiv (în eMedicine) despre Medicina genomică.*

Website-urile de acces la literatura bio-medicală . *Orice revistă medicală poate fi găsită în format tipărit şi/sau electronic folosind Google; la cerere puteţi primi automat informaţii despre conţinutul fiecărui număr ce iese din tipar al unei reviste preferate. Vom menţiona în mod special:*

LUCIAN BLAGA UNIVERSITY LIBRARY

- ***PubMed*** *(www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/) furnizează informaţii (rezumate) asupra articolelor publicate în revistele biomedicale; ele pot fi accesate pe autori, titluri, cuvinte-cheie etc.*
- ***New England Journal of Medicine*** *(www.nejm.org) – una din cele mai bune reviste medicale, care promovează medicina genomică şi este accesibilă gratuit pentru utilizatorii din România.*

În prima ediţie a cărţii de Genetica Medicală *(1994) am inserat la sfârşitul fiecărui capitol o listă de informaţii electronice şi website-uri. Între timp utilizarea internetului a devenit cotidiană pentru studenţi şi medici şi considerăm că aceste date nu mai sunt necesare. Sperăm ca prin această casetă să facilităm navigarea pe internet a celor care doresc să afle mai multe date despre Genetica medicală şi Medicina Genomică.*

Bibliografie specifică selectivă[17]

1. Auffray C, Hood L. *Systemic medicine: the future of medical genetics.* Genome Med 2009; 1:2.
2. Avard D. *Genomic medicine: considerations for health professionals and the public.* Genome Med 2009; 1:25.1-25.7.
3. Baird PA, Anderson TV, Newcombe HB, Lowry RR. *Genetic disorders in children and young adults: a population study.* Am J Hum Genet 1988; 42:677-693.
4. Bory P. *Coming of the age of personalized medicine.* Genome Med 2009; 1:109.1-109-3.
5. Epstein C. *Medical genetics in the genomic medicine of the 21st century.* Am J Hum Genet 2006; 78:434-438.
6. Feero WG. *Genomic medicine – an updated primer.* N Engl J Med 2010; 362:2001-2011.
7. Guttmacher AE, Collins FS. *Genomic medicine – a primer.* N Engl J Med 2002; 347:1512-1520.
8. Hamburg MA, Collins FSC. *The path to personalized medicine.* N Engl J Med 2010; 363:301-304.
9. Holtzman NA, Marteau TM. *Will genetics revolutionize medicine?* N Engl J Med 2000; 343:141-144.
10. Lawrence S, Giles CL. *Accessibility of information in the web.* Nature 1999; 400:107.
11. Maliţa, M. *Aurul cenuşiu. Eseuri rostite*, Ed. Dacia, Cluj, 1971.
12. Maximilian C. *Geneza individualităţii*, Ed. Sport-Turism, Bucureşti, 1980.
13. McKusick VA. *History of medical genetics.* În Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE. *Emery and Rimoin's Principles and practice of medical genetics.* ed. a III-a, vol. 1, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1996, 1-30.
14. McKusick VA. *Medical genetics: a 40-year perspective on the evolution of a medical specialty from a basic science.* JAMA, 1993; 270:2351-2356.
15. Norton ML. *Genome medicine: the future of medicine.* Genome Med. 2009; 1:1-3.
16. Peltonen I, McKusick VA. *Genomics and medicine: Dissecting human disease in the postgenomics era.* Science 2001; 291:1224-1229.
17. Varmus H. *Getting Ready for Gene-based Medicine.* N Engl J Med, 2002; 347:1512-1520.
18. Williams SJ, Hayward NK. *The impact of the Human Genome Project on medical genetics.* Trends Mol Med 2001; 7:229-231.
19. Wilson GN. *The genomics of human dysmorphology.* Am J Med Genet 1992; 43:187-196.
20. WHO Geneva. *Genomics and world health – report from the advisory committee on health research.* 2002.
21. ***. *Genetics-delivering the dreams?* BMJ 2001; 7293 (număr dedicat geneticii).

17. Bibliografia specifică selectivă cuprinde o selecţie de articole recente privitoare la capitol şi recomandate cititorilor pentru completarea informaţiilor. La sfârşitul cărţii există o bibliografie generală ce include tratate, monografii, cărţi de genetică umană şi medicală.

RCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 2

STRUCTURA ŞI ORGANIZAREA CELULARĂ A ADN

ADN este molecula fundamentală a vieţii. Toate mecanismele prin care se realizează structura şi funcţiile celulelor, organizate în ţesuturi şi organe, precum şi răspunsurile lor la acţiunea mediului intern sau extern – sunt codificate şi reglate de structura uimitor de simplă şi elegantă a moleculei de ADN. De aceea, înţelegerea structurii ADN şi a organizării sale în celule este fundamentală pentru studiul geneticii medicale şi a medicinii, în general.

A. ADN este substratul molecular al eredităţii

Evoluţia concepţiilor despre natura genei

anul 1865, Gregor Mendel a formulat *ipoteza stenţei genelor* potrivit căreia fiecare caracter e determinat de *„o pereche de factori ereditari"* umiţi mai târziu gene) şi a stabilit *legile eredităţii*. tfel, el a pus bazele geneticii ca ştiinţă.

Iniţial, în ipoteza lui Mendel, *gena era o entitate abstractă*, ipotetică, a cărei natură chimică era necunoscută. Ulterior, la începutul secolului XX, demonstrându-se rolul cromozomilor în ereditate (Walter Sutton, Theodor Boveri şi mai ales Thomas H. Morgan, premiul Nobel, 1933), gena a devenit un element concret, material, *un segment dintr-un cromozom care determină un caracter specific*, dar natura ei chimică a rămas în continuare necunoscută.

La începutul deceniului patru, s-a stabilit că în structura cromozomilor există proteine şi acizi nucleici: ADN şi ARN; una din aceste componente trebuia să fie substratul chimic al genei. Mulţi cercetători credeau atunci că genele sunt formate din proteine, cele mai complexe substanţe chimice din celule; ADN era considerat o moleculă prea simplă pentru înmagazinarea informaţiei ereditare şi transmiterea ei în succesiunea generaţiilor. Existau totuşi unele *argumente „indirecte"* care pledau pentru **rolul genetic al ADN**: localizarea aproape exclusivă a ADN în nucleu şi cromozomi, structuri cu rol important în ereditate; cantitatea sa constantă şi caracteristică speciei, proporţională cu numărul cromozomilor (celulele sexuale au jumătate din cantitatea de ADN a celulelor somatice); stabilitatea metabolică a moleculei de ADN. În 1944, Oswald Avery, Colin Mac Leod, Madyn McCarty (de la Institutul Rockefeller) au demonstrat experimental că ADN-ul este substratul molecular al eredităţii.

2. Demonstrarea rolului genetic al ADN

În 1928, microbiologul englez Frederick Griffith, studiind morfologia şi patogenitatea diferitelor tulpini de pneumococ, a făcut o observaţie remarcabilă. Unele tulpini aveau o capsulă polizaharidică şi cultivate pe agar formau colonii „netede", fiind numite S (de la *„smooth"*), iar altele erau necapsulate şi formau colonii „rugoase", fiind numite R (de la *„rough"*). Griffith a observat că şoarecii injectaţi cu pneumococi S au murit, iar cei injectaţi cu tulpina R au supravieţuit; deci, pneumococii S capsulaţi erau patogeni, producând septicemie şi moarte. Patogenitatea, determinată de prezenţa capsulei, se transmite ereditar. În mod surprinzător, un amestec de pneumococi R (*nepatogeni*) vii şi pneumococi S (*patogeni*) omorâţi prin căldură a avut un efect letal. De la animalele moarte s-au izolat surprinzător

pneumococi S vii. Explicația posibilă a acestui fenomen era **transformarea** tulpinilor de pneumococi R vii în tulpini S vii, sub influența unor componente din structura pneumococilor S inactivați; natura chimică a substanței care a produs transformarea nu a putut fi însă stabilită în epoca respectivă.

În 1944 Avery, Mac Leod, McCarty au reluat experiențele lui Griffith și au demonstrat că *factorul transformant este ADN*. Autorii au arătat că *transferul ADN* extras de la o tulpină de pneumococi S capsulați, patogeni, la pneumococi R necapsulați, nepatogeni, determină *transformarea* lor în pneumococi patogeni (R → S); mai exact, un segment de ADN-S, ce conține gena pentru capsulă, a fost încorporat în ADN pneumococilor R. Această modificare nu era realizată de proteine sau de alte componente din structura pneumococilor S și era *inhibată de enzima ADN-ază* (figura 2.1); odată produsă, modificarea *se transmite* la generațiile următoare de pneumococi, fiind deci *ereditară*. Pe această bază, s-a presupus că *ADN este materialul genetic.*

Așa cum se întâmplă adesea cu marile adevăruri, rolul genetic al ADN, clar și elegant demonstrat de Avery *et al.*, a fost însă un timp negat. În 1952, Alfred Hershey și Martha Chase (Premiul Nobel, 1969) au demonstrat că *transferul exclusiv al ADN* de la bacteriofagi la *Escherichia coli* transformă această bacterie în celule producătoare de particule fagice, cu o structură completă, inclusiv capsula proteică (figura 2.2). Autorii au marcat proteinele capsulare ale bacteriofagilor cu sulf radioactiv (^{32}S), iar ADN cu fosfor radioactiv (^{35}P); când bacteria *E. coli* a fost infectată cu bacteriofagi „marcați", se observă că numai ^{35}P (deci ADN) pătrunde în celulă, fracțiunea marcată cu ^{32}S (proteinele capsulare ale bacteriofagului) rămânând la exterior. Formarea ulterioară a unor particule fagice *noi*, *complete*, a demonstrat clar că ADN era unicul purtător al informației ereditare.

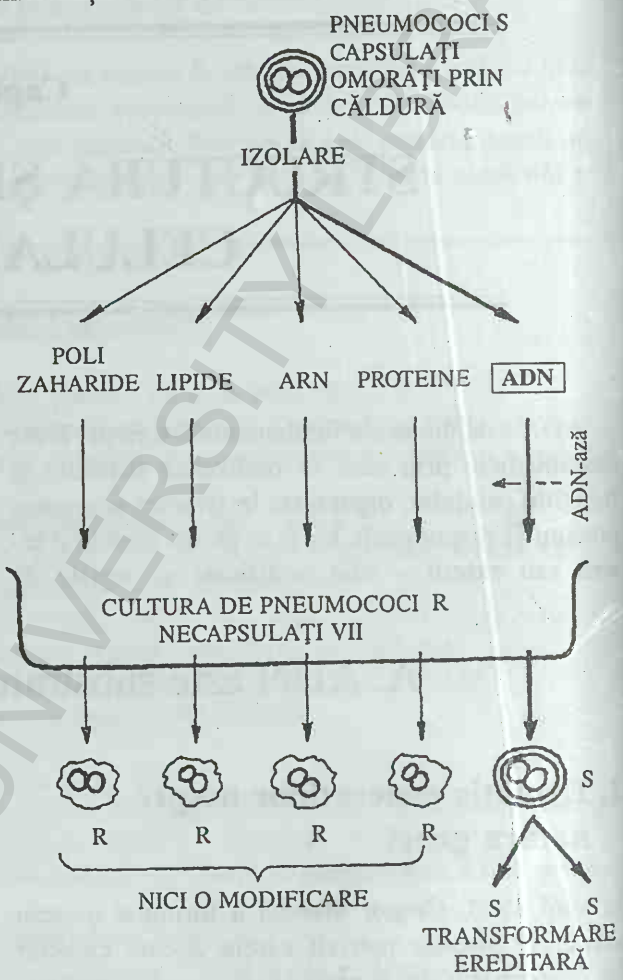


Figura 2.1. Demonstrarea rolului genetic al ADN

(modificat după Suzuchi *et al.*, 1991)

ADN este singura substanță extrasă din pneumococii S care transformă pneumococii R vii, necapsulați și nepatogeni, în pneumococi S vii, capsulați și patogeni; transformarea este permanentă și ereditară.

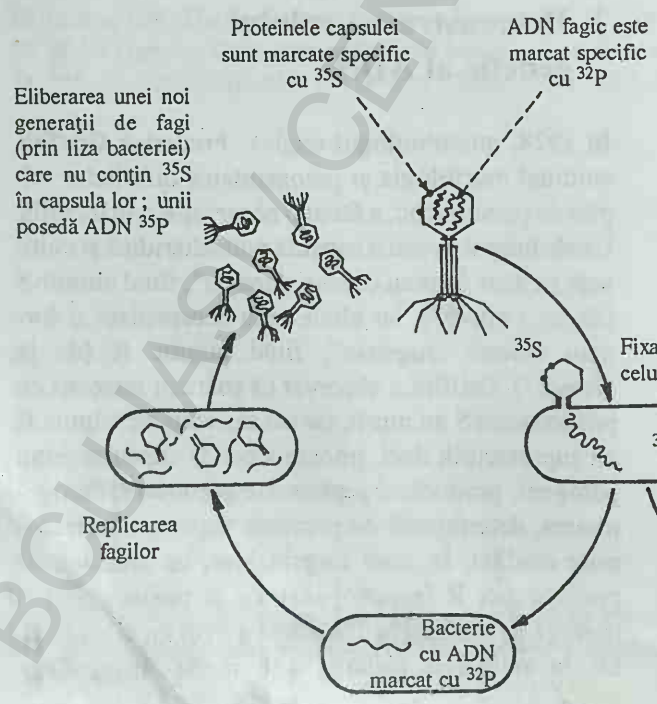


Figura 2.2. Reprezentarea diagramatică a experienței Hershey-Chase, care demonstrează că ADN este materialul genetic al fagilor

(modificat după Ayala și Kiger, 1984)

Autorii au marcat proteinele fagice cu ^{35}S și ADN fagic cu ^{32}P; în bacteriile infectate cu fagi pătrunde numai ADN marcat cu ^{32}P: se formează fagi noi cu o structură completă, inclusiv capsula proteică

BUCUREȘTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Demonstrarea faptului că transferul ADN de la un microorganism la altul produce transformări permanente şi ereditare ale primitorului a constituit dovada decisivă că *genele sunt alcătuite din ADN.* Experienţele de transformare ereditară produse de ADN şi numeroase alte dovezi au stat la baza unei noi paradigme fundamentale în biologie şi au inaugurat *revoluţia moleculară în genetică.* Introducerea unor segmente de ADN în celule cultivate *in vitro* (proces numit *„transfecţie"*) sau în zigoţi/embrioni (*„animale transgenice"*) stă la baza ingineriei genetice. Mai mult, ea reprezintă principiul de bază al terapiei genice, una din cele mai extraordinare realizări ale medicinii ultimilor ani.

B. Structura ADN

Descoperirea rolului genetic al ADN[1] a concentrat atenţia cercetătorilor asupra structurii sale, întrucât descifrarea ei reprezenta singura cale pentru înţelegerea naturii şi funcţiei genei. În anul 1953, James Watson şi Francis Crick au propus un model al moleculei de ADN alcătuit din două catene polinucleotidice, legate complementar prin bazele azotate, înfăşurate într-o elice dublă, răsucită spre dreapta.

Modelul Watson-Crick al structurii ADN reprezintă, probabil, cea mai mare descoperire a biologiei moderne (Premiul Nobel, 1962). Acest model, *universal* valabil în lumea vie, corespunde funcţiilor materialului genetic, deoarece explică modul în care se *stochează, se transmite şi se exprimă informaţia ereditară.* Gena încetează să mai fie o entitate „misterioasă", are o structură chimică complexă şi bine definită, iar ADN devine nu numai esenţa geneticii, ci şi un veritabil *„simbol al vieţii"*. Consecinţele pentru practica medicală ale revoluţiei determinate de descoperirea structurii şi funcţiei ADN sunt şi vor fi atât de spectaculoase, încât nu vor avea egal în istoria medicinii.

1. Structura primară şi secundară a ADN

1.1. Structura primară a ADN

ADN este un *macropolimer de „dezoxiribonucleotide"*. Lungimea şi greutatea sa moleculară sunt foarte mari, permiţând stocarea unei cantităţi uriaşe de informaţie. Cantitatea de ADN variază de la o specie la alta (la om, g.m. = $3{,}5\times10^{12}$ daltoni), dar este *constantă* la indivizii aceleiaşi specii, precum şi în toate celulele somatice (diploide) de la acelaşi individ.

Unitatea structurală a ADN este **dezoxiribonucleotidul**, alcătuit din trei elemente distincte – *un glucid* cu cinci atomi de carbon (o pentoză), *o bază azotată* şi un *grup fosfat* – unite prin legături *covalente* (puternice) (figura 2.3). Pentoza este reprezentată de **D-2-dezoxiriboză**, în forma sa furanozică. **Baza azotată,** care poate fi purinică – *adenina* (A), *guanina* (G) – sau pirimidinică – *timina* (T), *citozina* (C), se leagă la C_1, al dezoxiribozei, alcătuind împreună un **nucleozid**. Grupul fosfat (provenit din acidul ortofosforic) se leagă la C_5, al dezoxiribozei, formând cu aceasta şi baza azotată un **nucleotid**, unitatea fundamentală a structurii catenei de ADN. Grupul fosfat conferă moleculei de ADN caracterul de „acid" şi numeroase sarcini negative, neutralizate *in vivo* prin fixarea histonelor, proteine bazice. În ADN, există *patru tipuri de dezoxiribonucleotide* – acid dezoxiadenilic, dezoxiguanilic, dezoxicitidilic şi dezoxitimidilic – care se vor deosebi numai prin baza azotată; gruparea fosfat şi dezoxiriboza sunt elemente constante.

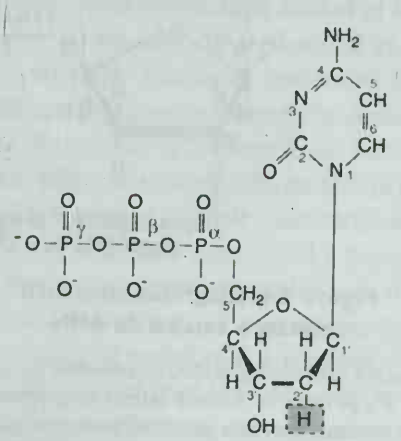


Figura 2.3. Structura unui dezoxiribonucleotid
(2'-Dezoxicitidina 5'- trifosfat)

Polimerizarea nucleotidelor, în molecula de ADN, se realizează prin *legături covalente 3'- 5' fosfodiester,* formate între gruparea OH a C_3 al dezoxiribozei unui nucleotid şi restul fosfat fixat la C_5 al nucleotidului următor. Se formează astfel o catenă (lanţ) *continuă*, *liniară* (neramificată), care

1. La unele virusuri materialul genetic este ARN; ele sunt numite *„retrovirusuri"* deoarece în timpul infecţiei se integrează în genomul celular după ce ARN lor a fost convertit în ADN, de către o enzimă numită *transcriptază inversă.* Unele din aceste virusuri produc cancere şi alte boli (SIDA).

ECOVAL CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

reprezintă **structura primară a ADN**. Această catenă prezintă o parte „constantă", fosfoglucidică (în care gruparea fosfat alternează regulat cu dezoxiriboza), ce formează axul catenei, şi o parte „variabilă", reprezentată de bazele azotate, care se fixează perpendicular şi lateral pe „coloana vertebrală" fosfoglucidică (bazele azotate de pe aceeaşi catenă nu se leagă între ele) (figura 2.4).

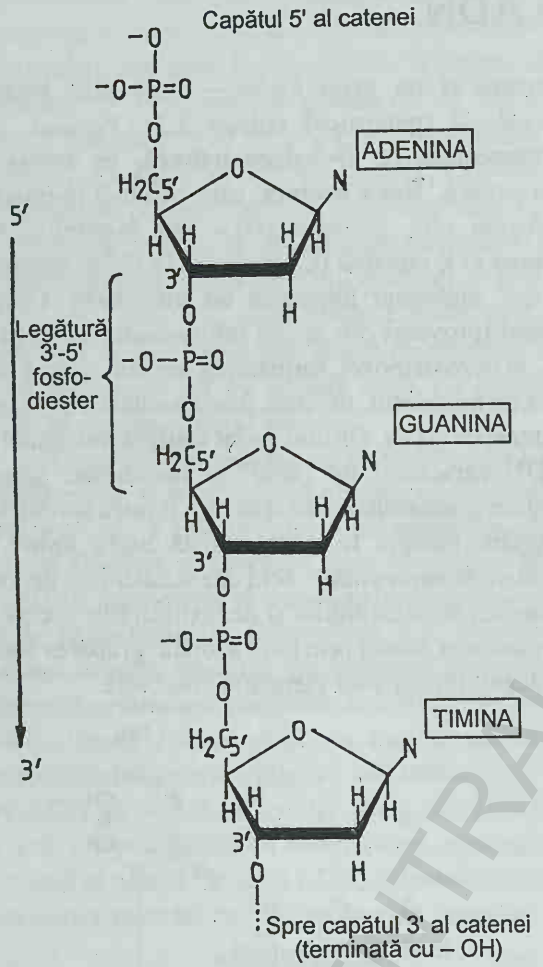


Figura 2.4. Diagrama structurii primare a catenei de ADN

Se observă axul fosfoglucidic, cu orientare (polaritate) 5' → 3', pe care se fixează lateral şi perpendicular bazele azotate. Secvenţa structurii prezentate se poate scrie: 5' pApGpT-OH (unde p este legătura fosfodiesterică, iar – OH este gruparea terminală de la capătul 3') sau, mai simplu, 5' AGT 3'.

În catena de ADN, poziţia unui nucleotid nu impune cu necesitate în vecinătatea sa prezenţa unui anumit alt nucleotid; poziţiile adiacente pot fi ocupate de *oricare* din cele patru tipuri de nucleotide. Deci nu există nici o restricţie în dispunerea/ succesiunea nucleotidelor în lungul catenei de ADN sau, altfel spus, există *o libertate totală de aşezare a nucleotidelor*. Acest lucru este esenţial deoarece secvenţa (ordinea) nucleotidelor în lungul catenei de ADN reprezintă **informaţia genetică codificată**, pe baza căreia se stabileşte *ordinea aminoacizilor în proteine*. Sensul de „*citire*" a informaţiei genetice este determinat de **polaritatea 5' → 3'** a catenei de ADN. Ea este dată de faptul că poziţiile 5'-fosfat al primului nucleotid şi 3'-hidroxil ale ultimului nucleotid al catenei sunt libere, neangajate într-o legătură chimică. Orice secvenţă de nucleotide se „citeşte" în direcţia 5' → 3' şi se scrie cu capătul 5' la stânga, de exemplu, 5'-ATGCCTAGATCA-3'. Fiecare catenă a ADN este deci o *secvenţă orientată*, definită prin înlănţuirea nucleotidelor.

1.2. Structura secundară a ADN

În elaborarea modelului structurii ADN, Watson şi Crick s-au bazat pe studiile difracţiei cu raze X a moleculelor de ADN (Maurice Wilkins, Rosalind Franklin), precum şi pe analizele chimice ale ADN (Edwin Chargraaf).

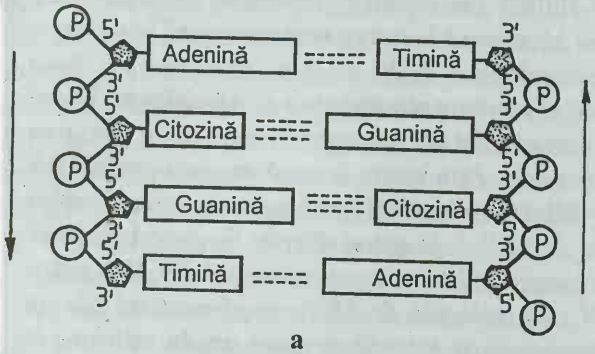
Imaginile obţinute prin difracţie cu raze X a unor molecule de ADN de origini diferite erau totdeauna asemănătoare, relevând deci un „model unic" şi sugerând că moleculele de ADN au o *organizare bine definită*, ordonată, în care părţile componente se repetă ele însele. Modelul sugerează existenţa mai multor catene polinucleotidice şi o structură elicoidală ordonată. Analizele chimice ale ADN au evidenţiat că suma bazelor purinice (A+G) este însă întotdeauna egală cu suma bazelor pirimidinice (T+C), iar raportul A/T şi G/C este unitar, indiferent de specie; în schimb, raportul A+T/G+C este diferit de 1 şi caracteristic fiecărei specii; la om este 1,7.

Prelucrând creator aceste date, Watson şi Crick au propus un model al moleculei de ADN alcătuit din **două catene polinucleotidice**, legate între ele prin bazele azotate, în mod *complementar* (figura 2.5.a) şi înfăşurate *plectonemic* pentru a forma o *dublă spirală elicoidală* (o elice dublă) *orientată spre dreapta*, cu diametrul de 20 Å şi pasul elicei de 34 Å (figura 2.5.b). Pornind de la faptul că raportul A/T = G/C = 1, Watson şi Crick consideră că în molecula de ADN se produce o împerechere „preferenţială" a bazelor care unesc cele două catene; bazele azotate (situate spre interiorul moleculei) se leagă *complementar*: o bază purinică se uneşte cu o bază pirimidinică sau, mai exact, A-T şi G-C (formând un cuplu sau o pereche de baze, prescurtat **pb**)[2] . Legăturile se realizează prin *punţi de hidrogen*, legături electrostatice slabe (figura 2.5.a). În felul acesta, secvenţa nucleotidelor unei catene determină cu necesitate secvenţa nucleotidelor celeilalte catene. Deci cele două catene ale ADN nu sunt identice, ci *complementare şi strict codeterminate*. Cunoaşterea

2. 1.000 pb de baze formează o kilobază, iar 1.000 Kb o megabază; genomul uman are 3.200 megabaze.

secvenţei nucleotidice a unei catene va permite automat determinarea secvenţei nucleotidice a celeilalte catene. De exemplu:

5'-ATGCCAG-3'
3'-TACGGTC-5'.



a

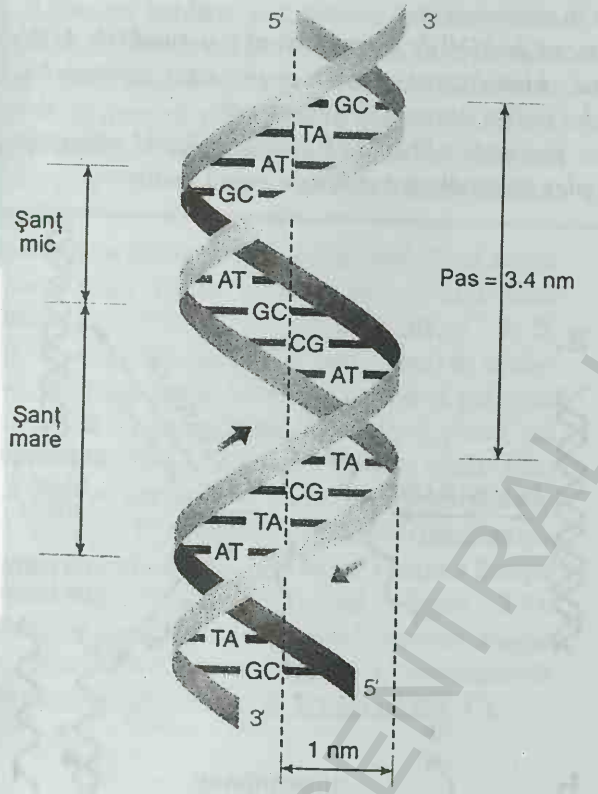


Figura 2.5. Structura secundară a ADN

(modificat după Strachan şi Read, 1999)

a) Cele două catene polinucleotidice ale ADN, legate complementar, cu dispoziţie antiparalelă datorită direcţiilor opuse ale legăturilor 3' – 5'; b) Dubla spirală elicoidală coaxială, dextrogiră, în care pasul elicei este 3,4 nm, iar diametrul ei de 2 nm; se observă cele două tipuri de şanţuri sau incizuri, mică şi mare

În acest context, vom sublinia o idee asupra căreia vom reveni: **legea complementarităţii bazelor** (A-T şi G-C) (*„regula Watson-Crick"*) stă la baza mecanismelor prin care se realizează funcţiile genetice ale ADN: transcripţia, replicarea, repararea leziunilor, recombinarea, precum şi a tehnicilor actuale de analiză a genelor.

Libertatea totală de aşezare a nucleotidelor în lungul catenelor de ADN (pe verticală) se asociază cu necesitatea dispoziţiei lor complementare (în planul orizontal al moleculei). *„Libertatea şi necesitatea dau substratului eredităţii înalta sa diferenţiere şi capacitate de a stoca, exprima şi transmite perfect mesajul pe care îl deţine"* (Parot, 1985). În molecula-simbol a vieţii este astfel „înscris" unul dintre principiile filosofice fundamentale ale existenţei omului: *libertate şi necesitate.*

Legăturile stereochimice/spaţiale necesare pentru împerecherea corectă dintre A-T şi G-C fac ca *orientarea (polaritatea) celor două catene să se dirijeze în sensuri opuse*, deci să fie **antiparalele**. Acest lucru are consecinţe importante în „citirea" informaţiei în procesul sintezei proteice, precum şi în mecanismul replicării (biosintezei unor noi molecule de ADN).

Cele două catene ale ADN se înfăşoară (se împletesc) *plectonemic* (una în jurul alteia, ca o „frânghie", şi amândouă în jurul unui ax central imaginar al moleculei), formând o *dublă spirală elicoidală coaxială* (o elice dublă), orientată spre dreapta (dextrogir) (figura 2.5.b). Ea poate fi comparată cu o *„scară în spirală"* în care axele fosfoglucidice formează marginile scării, iar perechile de baze, treptele ei. Această structură, asociată funcţiilor majore pe care le îndeplineşte ADN, a fost plastic numită „elicea vieţii", fiind un veritabil simbol al lumii vii.

Structura ADN este, în ansamblul ei, *perfect regulată*, ordonată: diametrul moleculei 20 Å (2 nm); o tură completă a elicei este de 36 Å sau 3,6 nm şi permite dispunerea a 10 perechi de baze (figura 2.5.b). În configuraţia ei spaţială, molecula de ADN prezintă *două şanţuri laterale* (incizuri): unul mai mic (12 Å) şi altul mai mare (24 Å). Ele sunt importante în *recunoaşterea* stereochimică şi fixarea pe ADN a diferitelor tipuri de *proteine cu care ADN interacţionează.* În şanţul mic se fixează *histonele* (proteine bazice mici care formează legături ionice cu axul fosfo-glucidic acid) care organizează ADN într-o structură compactă numită **cromatină.** Fixarea histonelor nu depinde de secvenţa nucleotidelor din ADN, dar modificarea lor chimică – prin metilare, fosforilare, acetilare – influenţează tăria interacţiunilor cu ADN pe care îl face astfel mai mult sau mai puţin accesibil proteinelor care reglează transcripţia. Aceste proteine – numite generic **factori de transcripţie** – se fixează în şanţul mare, (unde bazele sunt mai accesibile) dar numai pe anumite secvenţe (promotor) ale genelor. Am insistat asupra acestor interacţiuni ADN-proteine deoarece, aşa cum vom vedea, ele sunt decisive pentru organizarea şi funcţionarea ADN în celule.

BUCUR CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 2.1

Denaturarea şi hibridizarea ADN

În condiţii experimentale se poate produce ruperea (desfacerea) legăturilor de hidrogen dintre cele două catene, prin denaturare termică (încălzire la 63-100°C) sau chimică (tratament cu alcali etc.) (figura 2.6). Acest proces de conversie a ADN de la forma bicatenară la starea monocatenară se numeşte ***denaturare****. Prin răcirea lentă a soluţiei, monocatenele de ADN se pot reasocia pe baza complementarităţii şi reface structura originală; procesul se numeşte* ***renaturare*** *sau* ***hibridizare****. Viteza de reasociere depinde de concentraţia ADN şi timp (se numeşte cot de la concentraţie x timp; valoarea cot la care se produce o asociere de 50% se numeşte cot 1/2). Prin răcire bruscă monocatenele ADN rămân separate şi pot fi folosite pentru realizarea unor* ***hibrizi moleculari*** *(pe baza complementarităţii dintre catene) de tip ADN-ADN, fie între două molecule de ADN de la specii diferite fie între fragmente de ADN obţinute artificial (numite „sonde") şi regiunea corespunzătoare, complementară din ADN nativ. Se pot obţine de asemenea hibrizi între o catenă ADN şi o moleculă de ARN complementară (de tip ARNm) rezultând un heteroduplex. Fenomenele de denaturare şi hibridizare sunt amplu utilizate în genetica moleculară, în tehnicile ADN recombinant, şi în medicină în :*

- ***diagnosticul molecular:*** *hibridizarea între o monocatenă de ADN de la un pacient şi o sondă de ADN (marcată fluorescent) ce corespunde unei gene; hibridizarea sondei şi prezenţa semnalului fluorescent indică prezenţa genei; absenţa semnalului indică absenţa/deleţia genei;*
- ***terapia genică:*** *hibridizarea între ADN al bolnavului şi o moleculă de ARN (*oligonucleotid antisens*) complementară genei mutante produce un heteroduplex ce blochează expresia genei mutante.*

În condiţii fiziologice, molecula de ADN are o mare *stabilitate metabolică*, datorită legăturilor fizico-chimice dintre elementele unei catene precum şi dintre cele două catene[3]. Ele sunt strâns legate una de alta şi de obicei nu se pot separa. Această stabilitate este *o condiţie obligatorie* pe care trebuie să o îndeplinească substratul material al eredităţii. Totuşi, sub acţiunea unor enzime cele două catene ale ADN *se pot desface parţial*, pe segmente limitate, şi funcţionează ca „matriţă" pentru sinteza unor molecule noi, complementare (ARNm în procesul de transcripţie, sau o altă catenă ADN în cursul replicării). Catenele ADN pot fi separate în laborator una de alta, prin diferite „tratamente" (încălzire, tratare cu alcali). Aceste monocatene de ADN sunt folosite la realizarea unor hibrizi moleculari (caseta 2.1) în majoritatea tehnicilor de amplificare şi analiză a ADN (ce vor fi prezentate în capitolul 5)

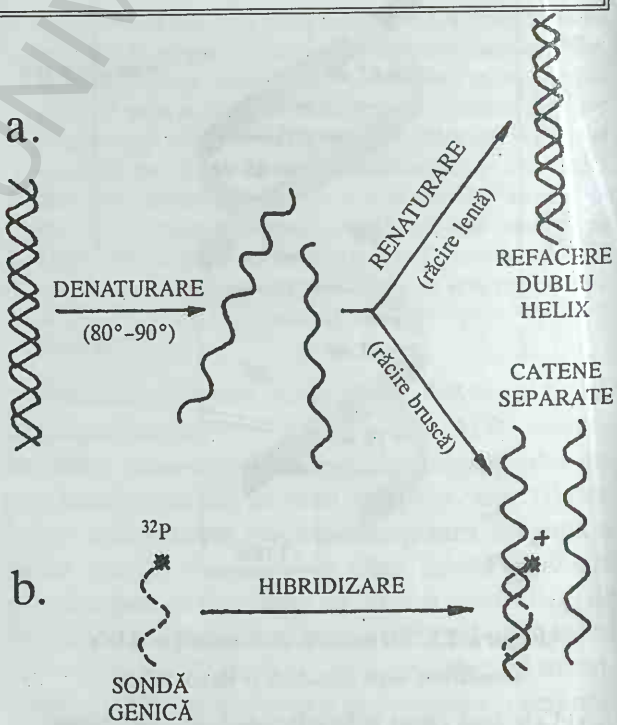


Figura 2.6. Denaturarea şi hibridizarea ADN

a) Denaturarea termică şi obţinerea de monocatene, prin răcire bruscă. b) Formarea unor hibrizi moleculari între o monocatenă de ADN şi o sondă genică marcată (cu ^{32}P sau cu un fluorocrom) care se va fixa în porţiunea de ADN cu o secvenţă complementară

1.3. Relaţiile dintre structura şi funcţiile ADN

Modelul structurii ADN întruneşte toate condiţiile pe care trebuie să le îndeplinească materialul genetic:

- să stocheze o *cantitate mare* de informaţie, într-o formă *stabilă*, dar uşor de exprimat;
- să *reproducă* informaţia (prin replicare) şi să o *transmită* cu mare fidelitate de la o generaţie la alta (prin diviziune), eventual să o „*repare*" corect, dacă se produce o leziune;
- să *exprime* informaţia genetică prin sinteza ARNm şi, pe această bază, a unor proteine specifice;
- să fie capabil de *variaţie*.

3. Deşi legăturile de hidrogen sunt legături electrostatice slabe, multitudinea lor asigură „coeziunea" catenelor.

BUCUREŞTI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Aceste proprietăţi fundamentale şi caracteristice ale ADN îi conferă calitatea de a fi *molecula esenţială a vieţii.*

a) Informaţia genetică

ADN deţine, prin genele pe care le posedă, informaţiile necesare pentru ca celulele să trăiască, să se multiplice şi să se diferenţieze (căpătând anumite specializări). În ansamblul organismului, ADN determină şi controlează embriogeneza, dezvoltarea, creşterea, metabolismul şi reproducerea – deci toate procesele majore ale funcţionării organismului uman. Informaţia genetică necesară acestor procese este reprezentată de *secvenţa liniară (succesiunea sau ordinea de înlănţuire) a nucleotidelor în molecula de ADN*; ea determină structura proteinelor care alcătuiesc celulele şi ţesuturile şi participă la funcţionarea lor complexă. Proteinele sunt formate din lanţuri de aminoacizi; secvenţa aminoacizilor în proteină determină proprietăţile caracteristice ale fiecărei proteine; această *ordine specifică a aminoacizilor este determinată de secvenţa nucleotidelor în ADN.*

Informaţia ereditară este *codificată*, fiind scrisă într-un limbaj foarte simplu, cu ajutorul unui „*alfabet nucleic*" ce are numai patru „litere": **A, T, G** şi **C** (corespunzătoare celor patru tipuri de nucleotide). Folosind aceste elemente de cod se pot scrie „*cuvinte*" de *trei litere*, asamblate într-o „*frază*" ce alcătuieşte o genă. La fiecare triplet de nucleotide, numit **codon**, corespunde pe baza **codului genetic** (vezi capitolul 4) un anumit aminoacid din structura proteinei sau un „semnal" necesar pentru a începe sau termina lectura mesajului (figura 2.7). *Informaţia genetică se „citeşte" într-un singur sens*, determinat de *polaritatea 5'→3'* a catenei de ADN (de exemplu, 5' AGTTGTAAACCA 3').

Gena este unitatea de informaţie ereditară; ea este alcătuită dintr-o succesiune specifică de codoni, ce determină ordinea aminoacizilor într-un polipeptid şi, prin aceasta, funcţia lui. Modificarea secvenţei nucleotidelor prin **mutaţia** genei va duce la modificarea unui/unor codon(i) şi, de cele mai multe ori, la modificarea structurii şi funcţiei proteinei sintetizate.

b) Expresia informaţiei ereditare

Expresia informaţiei ereditare reprezintă, în esenţă, *sinteza de proteine.*

Informaţia genetică codificată din ADN nu este folosită direct în sinteza proteinelor (figurile 1.1 şi 2.7). Ea este mai întâi copiată – **transcripţie** – într-o moleculă de ARNm, folosind acelaşi cod şi mecanismul complementarităţii. Urmează apoi **translaţia** sau decodificarea informaţiei genetice din ARNm într-o *secvenţă specifică de aminoacizi* a proteinei, pe baza corespondenţei dintre fiecare codon şi un anumit aminoacid.

Copierea informaţiei în ARNm se face numai de *pe una din catenele ADN*, în direcţia 3'→5'; această catenă a fost numită *catenă copiată sau matriţă*[4]. Ea este totdeauna aceeaşi pentru o anumită genă, dar la gene diferite poate fi una sau alta dintre catenele ADN (direcţia de copiere va fi însă diferită). Catena ADN complementară catenei transcrise este similară ca secvenţă cu ARNm (exceptând înlocuirea timinei cu uracilul) şi direcţie (5'→3') şi se numeşte *catenă de referinţă* sau catenă „sens". După desfacerea enzimatică, temporară, a legăturilor de hidrogen dintre cele două catene ale ADN, copierea se face în direcţia 3'→5', sintetizându-se o *moleculă* de **ARNm**, *complementară şi antiparalelă* (5'→3') faţă de catena matriţă; ea va avea aceeaşi secvenţă şi orientare ca şi catena de referinţă. De aceea, *notarea şi*

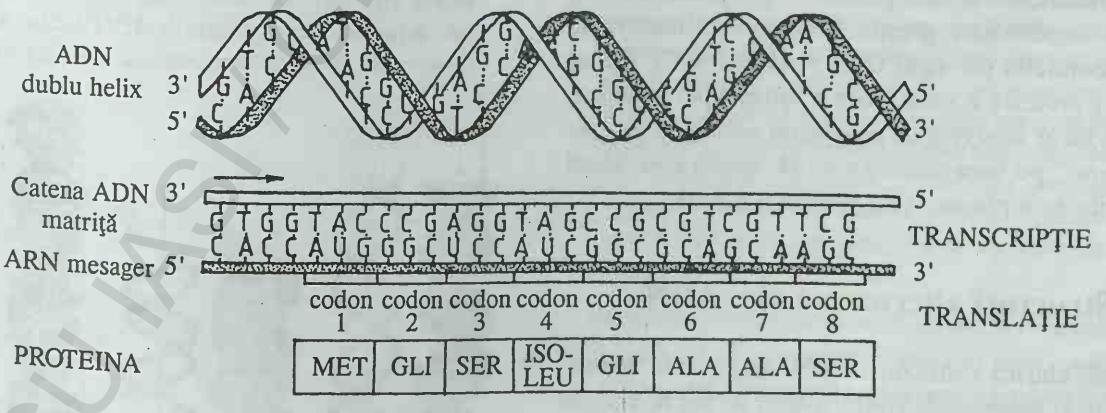


Figura 2.7. Informaţia genetică din ADN şi modul ei de expresie

Secvenţa de nucleotide din ADN determină sinteza unei proteine cu o anumită secvenţă de aminoacizi

[4] Catena 3' → 5' se mai numeşte şi *catenă antisens.*

descrierea unei gene se fac, convenţional, referindu-se la catena 5' → 3' de referinţă (sens) a ADN.

Mult timp, s-a considerat că fluxul informaţional este *unidirecţional*: ADN → ARNm → Proteină. Această *relaţie universală* pentru eucariote, numită şi *„dogma fundamentală a geneticii"* a fost reevaluată prin identificarea **„transcripţiei inverse"**, de la ARN → ADN. Anumite secvenţe din ADN (de exemplu LINEs) codifică o *transcriptază inversă* care permite ca un transcript ARN să poată fi copiat *„invers"* într-o secvenţă complementară de ADN. Prin acelaşi mecanism, *retrovirusurile*, care au ca material genetic ARN, se pot încorpora în genomul celulei gazdă, confecţionându-şi o copie complementară de „tip ADN". Fenomenul este larg folosit astăzi şi în tehnologiile ADN recombinant (vezi capitolul 5) pentru obţinerea unor molecule de **ADN complementar** faţă de ARNm extras din celule; în fond, acest **ADNc** reprezintă gena (mai exact partea codantă) pe baza căreia se va sintetiza ARNm şi apoi proteina corespunzătoare.

c) Replicarea şi repararea ADN

O proprietate esenţială a ADN este capacitatea de a servi ca model (matriţă/tipar) pentru **replicarea** sa şi sinteza a două noi molecule, *identice informaţional* între ele şi cu molecula iniţială. Pentru aceasta, cele două catene ale ADN *se desfac* şi fiecare catenă serveşte ca *matriţă* pentru aranjarea *secvenţială şi complementară* a dezoxiribonucleotidelor. Prin polimerizarea lor, se formează o catenă „nouă" care reface împreună cu catena *„veche"* o moleculă de ADN (vezi figura 1.1). Replicarea semiconservativă a ADN (vezi capitolul 6.A) este *cheia eredităţii*: un organism parental transmite prin gameţi o replică a ADN-ului său primei celule a descendenţilor. Astfel, prin replicare, *informaţia ereditară se perpetuează* în mod stabil în cursul generaţiilor.

Uneori, în cursul replicării se pot produce *erori*, prin împerecheri greşite (necomplementare) ale nucleotidelor (de tipul C-C, A-G sau A-C). Ele ar putea produce o modificare a informaţiei genetice, dacă nu ar interveni un *mecanism enzimatic de „reparare"*; pe baza catenei matriţă, acesta corectează erorile de replicare (vezi capitolul 6.A.4).

2. Structuri alternative ale ADN

Forma clasică a structurii ADN, descrisă de Watson şi Crick, corespunde conformaţiei de **tip B**, care se realizează frecvent *in vivo* (în condiţii de umiditate crescută şi concentraţie ionică joasă). Au fost descrise însă şi alte conformaţii sau **izoforme**: *A* şi *C*. Ele au *acelaşi plan general de structură*: elice dublă orientată spre dreapta, dar se deosebesc de tipul B printr-o serie de particularităţi fizice (înclinarea bazelor faţă de ax, modificarea pasului elicei şi numărul de baze per tură elice): *forma A este mai scurtă şi mai groasă, iar forma C mai lungă şi mai subţire.*

În organism, în anumite regiuni ale moleculei de ADN (cu o anumită secvenţă nucleotidică), se produc modificări (tranziţii) conformaţionale A ↔ B ↔ C. Aceste modificări permit *recunoaşterea* segmentelor respective de către anumite molecule exogene, care *reglează expresia genelor*.

În 1979, Alexander Rich şi Richard Dickerson descoperă un tip particular de **ADN-Z** sau **ADN-senestra**. El are o moleculă dublu elicoidală, *orientată spre stânga*, care îşi pierde simetria caracteristică formei B deoarece axul fosfo-glucidic ia o formă neregulată în *zig-zag*, producând deformarea şi alungirea moleculei de ADN (12 pb pe tură) care va avea un singur fel de incizuri (figura 2.8). Conformaţia ADN-Z este o conformaţie *normală*, ce există *in vivo* şi apare, în anumite condiţii fizico-chimice, în regiunile bogate în perechi de baze G-C; prin metilarea citozinei şi acţiunea unei topoizomeraze se produce rotirea bazelor cu 180° şi conversia formei B în Z; *tranziţia B ↔ Z este însă deseori reversibilă.*

ADN-Z intervine, foarte probabil, în *inactivarea unor gene* şi deci în controlul expresiei informaţiei genetice. Conversia locală B → Z (mai ales în situsurile de reglare a transcripţiei) poate fi realizată prin fixarea mai intensă a histonelor sau a altor molecule ce produc represia genelor sau prin metilarea citozinei din situsurile GC.

De remarcat faptul că în anumite regiuni (cu secvenţe nucleotidice repetitive) ADN dublu catenar poate forma structuri non lineare, ramificate *„cruciform"* sau *„în ac de păr"*, ce participă la instabilitatea regiunii şi favorizează mecanismul de amplificare a repetiţiilor. De asemenea, prin împerecheri particulare ale bazelor azotate (de tip Hoogsteen) în special purinice se pot forma structuri sub formă de *„triplă elice"* (prin interacţiunea unei molecule de ADN dublu catenar cu o moleculă de ADN monocatenar sau cu o moleculă

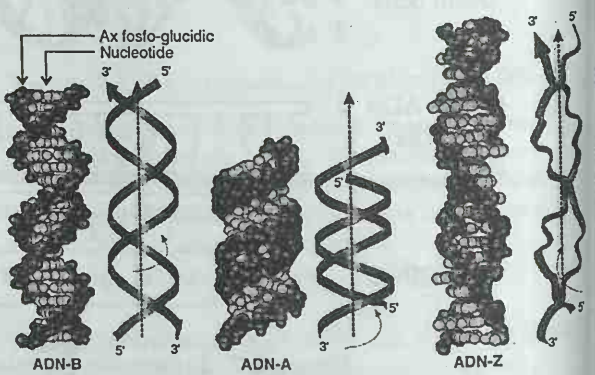


Figura 2.8. Forme alternative ale structurii ADN

(modificat după Passarge, 2007)

de ARN), care inhibă transcripţia, sau *„tetradele G"* (prin plierea unei singure catene de ADN şi împerecheri între patru guanine situate în acelaşi plan).

În finalul acestei prezentări este important de subliniat faptul că tranziţia ADN B ↔ Z, ca şi modificările conformaţionale A ↔ B ↔ C, care apar în limite regiuni ale ADN (cu o secvenţă specială a nucleotidelor), demonstrează elocvent faptul că molecula *de ADN nu are o structură fixă, rigidă, încremenită*. În funcţie de condiţiile de mediu, moleculele ADN sunt *flexibile*, într-o permanentă stare dinamică, deformându-se neîncetat; pe drept cuvânt, se poate spune că molecula de ADN (simbolul vieţii) *„pulsează sau respiră"*.

C. Organizarea ADN în celulă

Aparatul genetic

...icturile celulare care conţin ADN (nucleul şi ...ocondriile) şi cele care intervin în realizarea funcţiilor sale (ribozomii şi centriolii) alcătuiesc **aparatul genetic**. Nucleul este elementul principal al aparatului genetic, centrul de comandă şi control al tuturor activităţilor celulare. El conţine circa 99,5% din toată cantitatea de ADN a celului.

Structura nucleului diferă în cele două etape importante ale ciclului de viaţă al celulei, interfaza şi diviziunea. Fără a intra acum în detalii (vezi capitolul 6.B.1), vom preciza că interfaza este alcătuită (figura 2.9) din: *faza G_1* – presintetică, în care cromozomii despiralizaţi sunt *monocromatidieni* şi o singură moleculă de ADN, iar conţinutul total de ADN este *2C*[5]; *faza S* – în care se produce sinteza ADN, prin replicare semiconservativă, şi cantitatea de ADN a celulei se dublează la *4C*; *faza G_2* – postsintetică, în care cromozomii despiralizaţi sunt *bicromatidieni*, fiecare cromatidă fiind alcătuită dintr-o singură moleculă de ADN. La începutul **diviziunii** cromozomii se spiralizează, se condensează, şi devin vizibili la microscopul optic. În cursul mitozei se produce, prin disjuncţie (separare) cromatidiană, *distribuţia (segregarea) egală şi totală a materialului genetic dublat în faza S*.

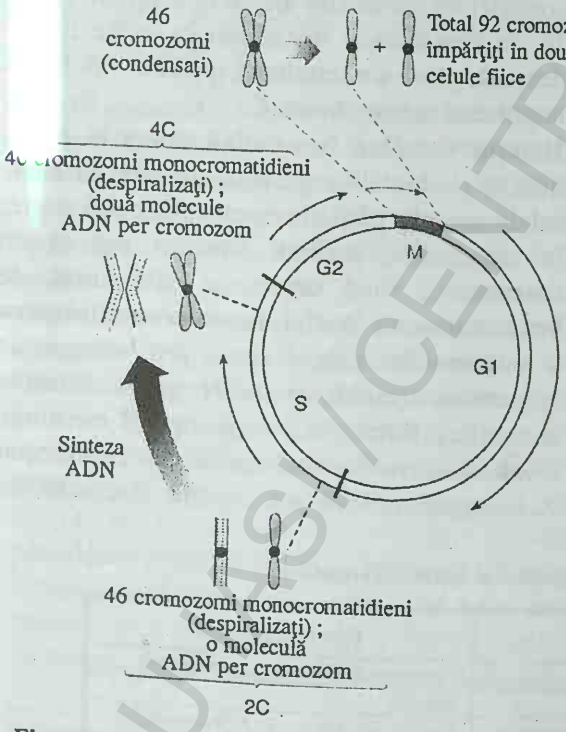


Figura 2.9. Fazele ciclului celular şi conţinutul de ADN al cromozomilor umani
(după Stracham şi Read, 1999)

Nucleul interfazic este delimitat la exterior de o *membrană lipidică dublă*. Foiţa externă a membranei nucleare se continuă cu membrana reticulului endoplasmic, în timp ce foiţa internă vine în contact cu nucleoplasma şi este căptuşită cu molecule de laminină A şi B. Membrana prezintă numeroşi pori, constituiţi din complexe proteice care facilitează schimburile nucleo-citoplasmatice. În interiorul nucleului se află un *nucleoschelet (matrice nucleară), cromatina, nucleoplasma şi* unul sau mai mulţi *nucleoli* (organite implicate în formarea ribozomilor).

> Matricea nucleară este constituită dintr-o reţea fibrilară complexă, formată din proteine şi ARN. Proteinele cu rol structural (actină, citokeratine, laminine, vimentină) constituie un „schelet intranuclear", ce permite ataşarea ordonată a moleculelor de ADN (prin intermediul zonelor de heterocromatină), ceea ce menţine forma sferică a nucleului; alte proteine au un rol funcţional, participând la realizarea/reglarea funcţiilor ADN. Mutaţiile ce modifică aceste proteine (în special laminina) produc diferite boli (*leucodistrofia autozomal dominantă, distrofia musculară autozomal dominantă Emery-Dreifuss, lipodistrofia parţială de tip 2 sau progeria de tip Hutchinson-Gilford*).

În nucleu, fiecare moleculă de ADN se *asociază* cu proteine histonice, nehistonice şi mici cantităţi de ARN, formând un complex nucleo-proteic numit **cromatină**. Interacţiunile dintre ADN şi proteine (încă insuficient elucidate) au un *rol structural* fundamental în organizarea supramoleculară a

5. C – reprezintă cantitatea ADN din celulele heploide.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ADN, precum şi un *rol funcţional* în mecanismele complexe care reglează expresia şi replicarea genelor.

Moleculele de ADN şi histone suferă *spiralizări succesive*, alcătuind un sistem ierarhizat de **fibre de cromatină**, de dimensiuni diferite. Ele realizează *„compactarea ordonată"* a moleculelor lungi de ADN în spaţiul nuclear redus.

La începutul diviziunii, membrana nucleară şi nucleolii dispar, iar fibrele de cromatină se spiralizează, se condensează şi formează **cromozomii**; la sfârşitul diviziunii, aceştia se despiralizează, pentru ca în interfază să revină la configuraţia filamentelor de cromatină. Cromatina şi cromozomii sunt *două modalităţi diferite de organizare morfo-funcţională* a materialului genetic, în interfază şi diviziune.

O dovadă elegantă a acestei afirmaţii o reprezintă „fenomenul de **condensare prematură** a cromozomilor". El se realizează prin *fuzionarea experimentală* a unei celule în diviziune (metafază) cu o celulă interfazică (în faza G_1, S sau G_2). Se produce o „sincronizare" a celulei interfazice şi o condensare precoce a filamentelor fine de cromatină, care vor prezenta toate detaliile morfologiei cromozomilor, fiind monocromatidieni, dacă celula se află în G_1, sau bicromatidieni, dacă inducerea condensării s-a făcut în faza G_2 (pentru celulele în faza S, condensarea precoce determină un aspect „pulverizat" al cromatinei). De menţionat că, prin tehnica condensării precoce a cromozomilor, pot fi vizualizaţi şi analizaţi cromozomii gameţilor prin condensarea fibrelor de cromatină din nucleii celulelor germinale interfazice.

2. Cromatina

La nivelul nucleului, ADN-ul este întotdeauna asociat cu proteine histonice şi nonhistonice, rezultând o structură numită **cromatină**; aceasta se prezintă sub două tipuri morfo-funcţionale distincte: eucromatina şi heterocromatina (tabel 2.1)

2.1. Eucromatina şi heterocromatina

Eucromatina reprezintă segmentul activ al genomului. Cea mai mare parte a eucromatinei conţine secvenţe unice de ADN (în care predomină perechile de baze G-C şi proteine nehistonice) şi se replică precoce, la începutul fazei S. Eucromatina este puţin condensată, colorată difuz, şi alcătuieşte benzile G negative ale cromozomilor.

Heterocromatina este constituită din segmente inactive genetic (sau cu activitate genetică redusă); conţine mai mult ADN repetitiv (în care predomină pb A-T şi histone) şi se replică tardiv, la sfârşitul fazei S. Hetereocromatina este foarte compactată şi se colorează intens, formând *cromocentri* în nucleul interfazic şi benzile G pozitive (sau R negative) ale cromozomilor. Deşi inactivă genetic (transcripţional), heterocromatina îndeplineşte cu siguranţă anumite funcţii celulare. Se presupune că heterocromatina stabilizează centromerul şi telomerele cromozomului, intervine în desfăşurarea meiozei (în sinapsa cromozomilor omologi) şi, probabil, în diferenţierea celulară. Heterocromatina este de două feluri: constitutivă şi facultativă

- **Heterocromatina constitutivă** se găseşte constant sub formă condensată, în toate celulele organismului. Ea nu conţine gene funcţionale şi este formată din ADN înalt repetitiv (ADN satelit). În structura cromozomului, heterocromatina constitutivă se află în regiunea centromerică şi pericentromerică, pe braţul lung al cromozomului Y, pe braţele scurte ale acrocentricilor şi în constricţiile secundare ale cromozomilor 1, 9 şi 16. În cromozomii metafazici ea poate fi evidenţiată, printr-un tratament specific, sub forma unor benzi numite **benzi C**.
- **Heterocromatina facultativă** diferă la celule diferite şi chiar la organisme diferite: în unele celule, anumite părţi din cromozomi pot fi active; în alte celule, aceleaşi structuri pot să nu funcţioneze, fiind organizate sub formă de heterocromatină. Astfel, **heterocromatinizarea** ar interveni în reglajul genic, prin mecanisme epigenetice (metilarea ADN şi modificarea histonelor). Exemplul cel mai tipic îl constituie *cromatina sexuală*; unul din cei doi cromozomi X, la organismele de sex feminin, este inactivat

Tabelul 2.1. Caracteristicile eucromatinei şi heterocromatinei

Caracteristici	Eucromatina	Heterocromatina
Condensare	Fin dispersată	Puternic condensată (cromocentri)
Colorare	Slabă, difuză	Intensă
Compoziţie chimică	Predomină: pb C - G; ADN nerepetitiv; proteine nehistonice	Predomină: pb A - T; ADN repetitiv; proteine histonice
Poziţie în cromozomi	Benzile G negative	Benzile G pozitive
Concentraţie genică	Mare	Foarte mică/absentă
Replicare în faza S	Precoce	Tardivă
Activitate genetică	Activă transcripţional	Inactivă transcripţional

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITAR

formând **cromatina X**. Procesul se produce la întâmplare şi independent în fiecare celulă.

Heterocromatina a fost definită iniţial pe bază morfologică; în prezent este definită în termeni de modificări epigenetice care reglează activitatea transcripţională şi determină modificări ereditare, dar reversibile în expresia genelor.

2.2. Cromatina sexuală

Cromatina sexuală reprezintă un corpuscul nuclear de heterocromatină (un cromocentru) cu particularităţi morfologice bine definite, care permite stabilirea numărului de cromozomi sexuali şi, prin aceasta, *determinarea sexului genetic (XX sau XY) şi evidenţierea unor eventuale anomalii numerice ale cromozomilor sexuali.*

Cromatina sexuală se prezintă diferit la femeie şi la bărbat, deoarece rezultă prin mecanisme diferite.

- La femeie (XX), cromatina sexuală este rezultatul *inactivării unuia din cei doi cromozomi X*, care formează în nucleii celulelor somatice un corpuscul de heterocromatină numit **corpuscul Barr** sau cromatină X.
- La bărbat (XY), cromatina sexuală reprezintă *heterocromatina braţului lung* al cromozomului Y, care se vizualizează la microscopul cu fluorescenţă, prin afinitatea particulară pentru diferite substanţe fluorescente (în special quinacrină); de aceea se mai numeşte **corpusculul F** sau cromatina Y.

a) Cromatina X (Barr şi Bertram, 1949)

Cromatina X rezultă la femeile XX prin **inactivarea** unuia din cei doi cromozomi X (detalii în capitolul 4.D.1.2), care prin condensare (heterocromatinizare) va forma corpusculul Barr. În felul acesta, atât la femeie cât şi la bărbat, *numai un singur X rămâne funcţional*; la ambele sexe, toţi cromozomii X în plus vor fi heterocromatinizaţi. Potrivit **ipotezei Lyon** (1961), inactivarea cromozomului X^6 este (aproape) *totală*, se produce *precoce* în perioada embrionară şi este *definitivă*, pentru toată viaţa[7]. Procesul de inactivare a unuia din cei doi cromozomi X (de origine maternă şi paternă) se produce la *întâmplare* şi *independent* în fiecare celulă. Femeile normale sunt astfel *un mozaic* cu două populaţii celulare, fiecare exprimând un cromozom X cu origine parentală diferită[8].

Cromatina X se poate evidenţia pe frotiuri realizate cu celulele diferitelor mucoase (de obicei mucoasa bucală), pe frotiuri de sânge (în polimorfonuclearele neutrofile), în bulbul pilos, în celule amniotice şi în celule obţinute prin biopsia diferitelor organe.

În *celulele epiteliale ale mucoasei bucale* cromatina X se prezintă sub forma unui *corpuscul de heterocromatină* (cromocentru) intens colorat bazofil, situat de obicei pe faţa internă a membranei nucleare, ovalar sau plan convex, cu mărime medie de un micron (± 0.3)[9], numit **corpusculul Barr** (figura 2.10.a). Prin caracteristicile sale el poate fi *deosebit* de nucleol sau de alţi cromocentri nespecifici. Teoretic, toţi nucleii celulelor provenite de la persoane normale de sex feminin ar trebui să aibă un corpuscul Barr. În practică, procentul celulelor *„cromatină X pozitive"* este cuprins între 15-35% datorită: calităţii improprii pentru analiză a unor nuclei şi, probabil, acţiunii unor factori celulari care produc decondensarea cromozomului X fără a afecta însă inactivarea lui. *Numărul de corpusculi Barr este egal cu suma cromozomilor X - 1.* În felul acesta, pe baza numărului de corpusculi

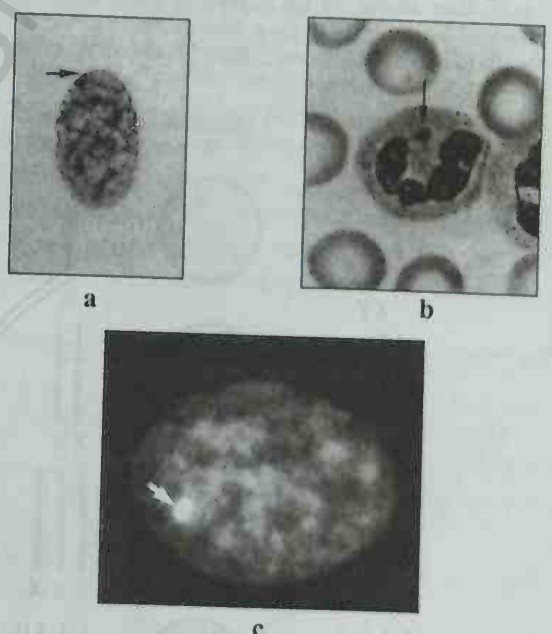


Figura 2.10. Aspectul morfologic al cromatinei sexuale

a) Cromatina X sub formă de corpuscul Barr într-o celulă din mucoasa bucală; b) Cromatina X sub formă de apendice nuclear „în băţ de tobă" (tip A) într-un polimorfonuclear neutrofil; c) Cromatina Y sub formă de corpuscul F într-o celulă din mucoasa bucală

6. Inactivarea unui cromozom X este un fenomen epigenetic al cărui mecanism va fi discutat în capitolul 4D.
7. În toate celulele ce derivă dintr-o anumită celulă embrionară se păstrează inactiv acelaşi cromozom X.
8. Femeile heterozigote $X^N X^a$ – care teoretic ar trebui să fie sănătoase deoarece alela N este dominantă, iar alela a este recesivă – vor avea 50% celule în care X^a este activ şi pot prezenta semne minore de boală.
9. Corpusculul Barr este mai mare decât de obicei la femeile cu izocromozom X de braţ lung şi mai mic la femeile cu deleţie X de braţ lung.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

Barr, se poate preciza numărul cromozomilor X şi diagnostica[10], simplu şi repede, sexul genetic şi diferite anomalii numerice: X0, XXX, XXY etc. (figurile 2.11 şi 2.12).

În *polimorfonuclearele neutrofile* (PMN) cromatina X se poate prezenta sub forma unor **apendici nucleari**, fie *„în băţ de tobă"* (apendice tip A, pediculat) (figura 2.10.b), fie ca un *„nodul sesil"* (apendice de tip B). Pentru o evaluare corectă ei trebuie deosebiţi de alţi apendici nesexuali. Numărul apendicilor sexuali este, ca şi în cazul corpusculului Barr, egal cu suma cromozomilor X minus 1.

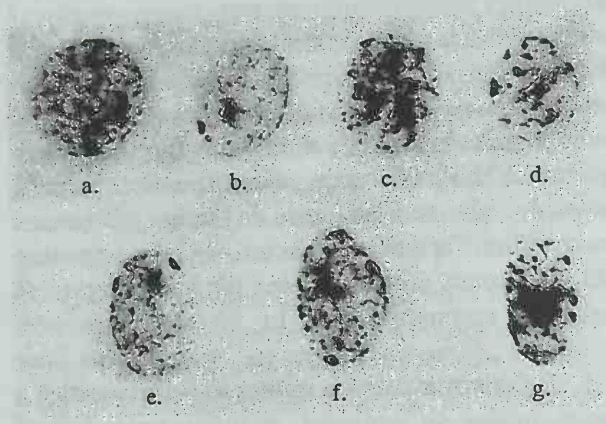


Figura 2.11. Corpusculul Barr în nuclei de celule din mucoasa bucală

(pentru interpretare, vă raportaţi la figura 2.12)

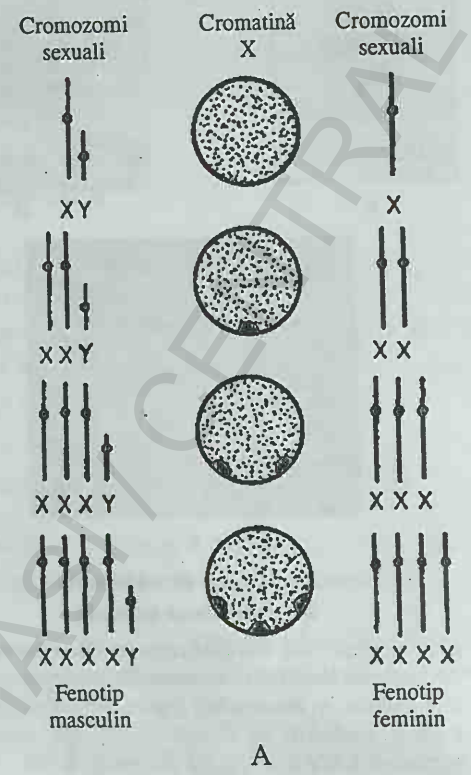
a) C. Barr absent; b) Un c. Barr; c) Un c. Barr de dimensiuni mai mici; d) Un c. Barr de dimensiuni mai mari; e) doi c. Barr; f) trei c. Barr; g) patru c. Barr

b) Cromatina Y

În celulele prelevate de la o persoană de sex masculin (XY) se poate evidenţia, prin coloraţia cu diferiţi fluorocromi (quinacrină) şi examinare microscopică în lumină ultravioletă, un corpuscul intens fluorescent, numit **corpuscul F** (figura 2.10.c). El reprezintă aspectul interfazic al celor 2/3 distale al braţului lung al cromozomului Y, alcătuite din heterocromatină intens fluorescentă. Mărimea medie a corpusculului F este 0,25 microni, iar *numărul de corpusculi F este, firesc, egal cu numărul cromozomilor Y.* De aceea el lipseşte la persoanele feminine, este prezent într-un singur exemplar la bărbaţii normali (XY) şi în două exemplare la bărbaţii XYY.

2.3. *Structura supramoleculară a cromatinei*

Analiza cromatinei la microscopul electronic evidenţiază un *sistem ierarhizat de fibre de cromatină*, de dimensiuni diferite (figura 2.13), alcătuite din ADN, histone şi proteine nehistonice (caseta 2.2). Ele au rolul de „a împacheta" (compacta) genomul diploid (~2m lungime) în cromozomi (lungime totală în metafază ~230 μm) şi nucleu (10 μm



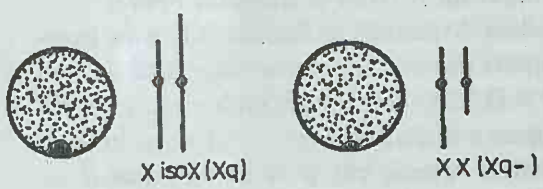


Figura 2.12. A) Relaţia dintre numărul cromozomilor X şi numărul corpusculilor Barr; B) Relaţia dintre anomaliile de structură ale cromozomului X şi mărimea corpusculului Barr

10. În laboratoarele cu dotări pentru FISH se folosesc sonde marcate fluorescent specifice centromerului cromozomilor X şi Y, care permit evaluarea mai precisă a prezenţei şi numărului cromozomilor sexuali în nucleii interfazici.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 2.2

Proteinele histonice şi nehistonice

Histonele *sunt proteine bazice, de mici dimensiuni, prezente la toate eucariotele, cu mare afinitate pentru ADN, fixându-se pe mica incizură şi neutralizând sarcinile acide. Genele care codifică histone au o structură particulară (monoexonice, fără introni), se află în mai multe exemplare (peste 60), localizate pe cromozomii 1, 4, 6, 7, 11, 12, 17 şi 22; ele se exprimă în faza S a ciclului celular, sincron cu replicarea ADN. După numărul şi tipul de aminoacizi se deosebesc cinci tipuri de histone prezente la toate eucariotele:* ***H1, H2A, H2B, H3 şi H4****. Cu excepţia histonei H1, celelalte tipuri (şi mai ales H3 şi H4) au o structură stabilă, bine conservată în evoluţie, ceea ce relevă rolul structural important pe care îl au aceste proteine în organizarea supramoleculară a ADN şi compactarea lui în nucleu. Ele intră în alcătuirea* ***nucleozomilor****, particule fundamentale din structura fibrelor de cromatină. Histonele au însă şi roluri funcţionale (acţionând prin „capetele" terminale, ce ies din nucleozom şi pot fi modificate: metilare, acetilare, fosforilare etc.); ele sunt implicate în reglarea epigenetică a expresiei genelor (transcripţie): acetilarea histonelor determină activarea genelor, în timp ce metilarea lor produce, în funcţie de rezidiul aminoacidic interesat, fie activarea, fie represia genică. Fosforilarea histonei H1 provoacă condensarea fibrelor de cromatină interfazică în cromozomi şi declanşează mitoza. Ipoteza „codului histonic" presupune că modificările histonelor sunt mecanisme fundamentale pentru inducţia şi stabilizarea unor subdomenii cromozomiale condensate (heterocromatină) sau puţin condensate (eucromatină). Pe lângă tipurile majore de histone enumerate mai sus, există şi o serie de variante histonice care sunt asociate unor anumite regiuni cromozomiale sau îndeplinesc funcţii specializate.Un astfel de exemplu este histona* $H1^0$ *(numită şi H5) care lipseşte în celulele care se divid şi apare în celulele diferenţiate sau celulele aflate în faza* G_0*. Histona H2AX este implicată în procesele de reparare şi recombinare a ADN, iar o variantă a H3 este proteina CENP-A care are rol major în formarea centromerilor.*

Proteinele nehistonice *sunt proteine acide şi neutre, numeroase, eterogene şi puţin abundente; o excepţie o constituie grupul proteinelor HMG („high mobility group"). Unele proteine nehistonice au un rol structural formând „matricea" cromozomilor, dar majoritatea au roluri funcţionale, intervenind specific în reglarea sau modularea activităţii genelor. Ele se fixează la ADN în marea incizură laterală, mai ales în zonele de ADN bogate în pb A-T, în special la nivelul situsurilor SAR („scaffold attachement region"); aici se produce o competiţie între proteinele HMG şi histonele H1: dacă predomină proteinele HMG, bucla respectivă de cromatină va reprezenta un domeniu activ, în timp ce fixarea preponderentă a histonei H1 conduce la o inactivare regională a cromatinei. Proteinele HMG participă probabil la reglarea transcripţiei şi replicării ADN.*

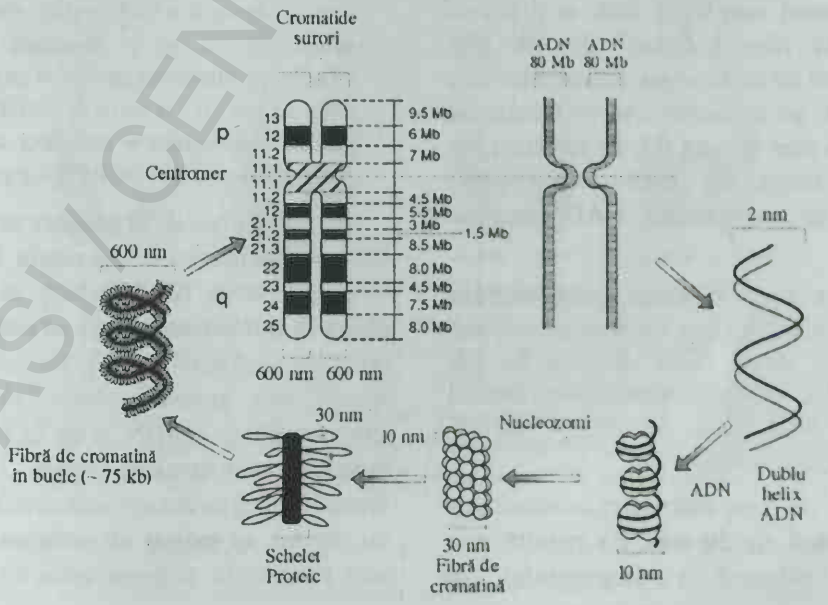


Figura 2.13. Structura supramoleculară a ADN în fibre de cromatină şi cromozomi (după Strachan şi Read, 1999)

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

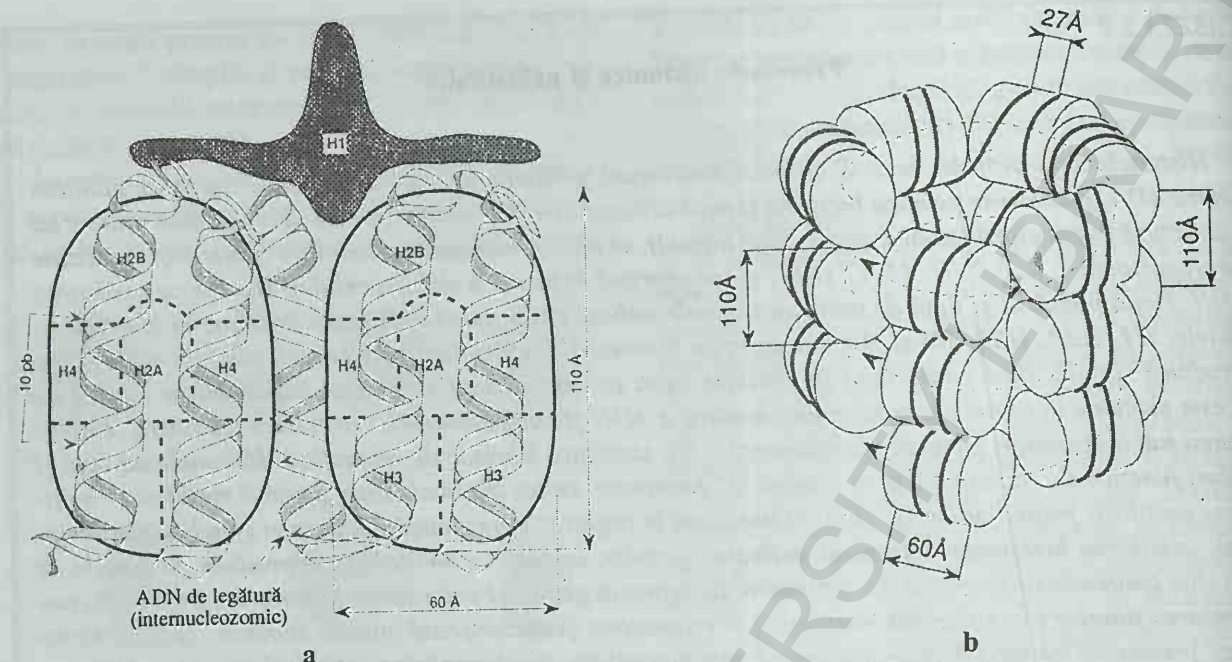


Figura 2.14. Structura filamentului cu nucleozomi de 10 nm şi a fibrei de cromatină în solenoid, cu diametrul de 30 nm

(modificat după Kaplan şi Delpech, 1993)

a) Doi nucleozomi, formaţi dintr-un octamer de histone în jurul căruia se înrulează ADN, sunt conectaţi prin intermediul histonei H1; b) spiralizarea în solenoid a filamentului cu nucleozomi va forma fibra de cromatină de 30 nm

diametru), asigurând în acelaşi timp posibilitatea efectuării transcripţiei sau replicării.

Primul nivel de organizare supramoleculară a ADN este **filamentul cu nucleozomi**, cu diametrul de 10 nanometri. **Nucleozomul** este unitatea fundamentală (repetitivă) a structurii cromatinei, fiind alcătuit dintr-un „miez" histonic cilindric (format din 8 molecule, câte două din histonele H2A, H2B, H3 şi H4) în jurul căruia se înfăşoară (1 tur şi 3/4) o secvenţă de ADN (de 147 pb) (figura 2.14.a). Nucleozomii sunt legaţi între ei printr-un *segment de ADN liber* (*„linker" de* ~80 pb), formând filamentul cu nucleozomi, asemănător unui *„şirag de mărgele pe o sfoară"*. Această structură (menţinută strâns prin histona H1, ce se fixează la ADN liber şi leagă doi nucleozomi vecini) realizează o rată de „împachetare" a ADN nativ de circa 10:1.

Mecanismul prin care se formează nucleozomii este încă puţin cunoscut. Cert este faptul că nucleozomii nu sunt structuri statice, rigide, deoarece funcţiile ADN (transcripţia, replicarea, recombinarea) necesită separarea celor două catene ale ADN şi, implicit, modificarea poziţiei nucleozomilor.

Al doilea nivel de compactare a cromatinei este **fibra de cromatină de 30 nm.** Ea rezultă prin spiralizarea în solenoid a filamentului cu nucleozomi (figurile 2.13 şi 2.14.b) şi realizează o compactare de 5:1. Această structură (cu pasul de 6-8 nucleozomi) este stabilizată de histona H1 (fixată în interiorul solenoidului), care prin cele două braţe laterale conectează nucleozomii învecinaţi.

Fibra de cromatină are însă şi un rol important pentru *funcţionarea genomului*, deoarece, prin spiralizare, apropie mult diferite regiuni ale ADN care, liniar, se află la distanţe mari unele de altele. În felul acesta, favorizează *interacţiunile genice* necesare pentru expresia adecvată a informaţiei ereditare. Mai mult, solenoidul *nu are o structură omogenă*: zonele spiralizate alternează neregulat cu zone nespiralizate, unde se pot fixa o serie de proteine specifice, care produc o configuraţie mai laxă ce permite accesul ARN polimerazei şi deci transcripţia.

Al treilea nivel de organizare rezultă prin plierea fibrei de cromatină de 30 nm în *bucle laterale* de lungimi diferite (20-100 kb); se formează **fibra pliată în bucle laterale**, cu un diametru de 300 nm (grad de compactare 10:1). Buclele sunt ataşate în spirală, prin anumite *situsuri de ancorare*[11] din structura fibrei de ADN, la un „schelet" *sau* matrice proteică (nonhistonică) (figura 2.13), care are o formă identică cu cea a cromozomului metafazic. Studii recente au indicat că **matricea cromozomială** este constituită dintr-un complex proteic fibrilar

11. „Regiunile de ataşare la matrice" (prescurtarea în engleză, SAR de la *„scaffold attachement region"* – sau MAR – *„matrix attachement region"*) sunt regiuni de aproximativ 300 pb bogate în AT.

numit *structura de menţinere a cromozomilor* (SMC – *Structural Maintenance of Chromosome*). Fibrele acestui complex sunt elastice[12] şi au o dispoziţie paralelă cu cromatidele cromozomilor pe toată lungimea acestora. Se consideră că fiecare buclă sau domeniu (ce conţine câteva gene) ar putea fi *o unitate funcţională, de transcripţie şi replicare*; buclele au deci atât o semnificaţie structurală, cât şi un rol funcţional important.

Buclele fibrei de 300 nm *se fixează neregulat* de scheletul proteic. Din loc în loc (în regiuni de ADN în care predomină secvenţe cu pb A-T), ele formează *mici aglomerări de bucle*, numite **cromomere**, separate prin zone mai laxe. Pe măsură ce cromozomul profazic se condensează, cromomerele mici, vecine, se unesc într-o structură mai mare. Aceste cromomere mari se adună în grămezi şi formează benzi intens condensate şi colorate (benzi G pozitive); ele vor fi separate prin benzi mai puţin condensate şi mai clare (benzi G negative).

ADN care formează benzile G (sau Q) conţine mai multe puncte de ataşare, strâns apropiate, iar buclele sunt mai dense, mai compactate; coloranţii (Giemsa, Quinacrină) care au afinitate pentru regiunile SAR, bogate în A-T, vor da benzi G. În benzile R, densitatea punctelor de ataşare este mai mică, iar buclele sunt mai laxe.

Benzile cromozomiale reflectă *structura internă heterogenă* a cromozomului şi definesc *regiuni din genom care au proprietăţi şi funcţii diferite.*

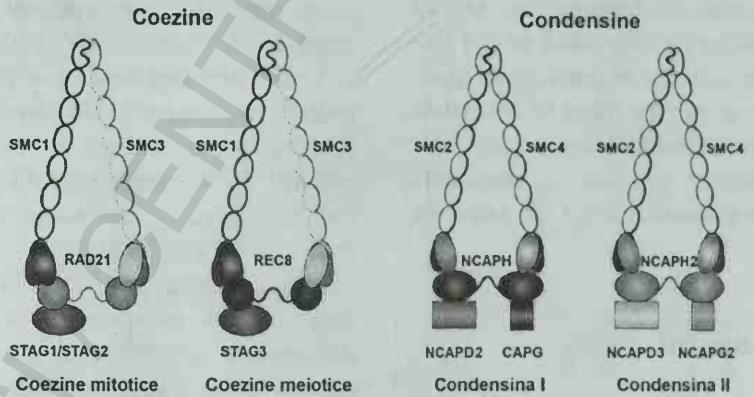
La sfârşitul fazei G_2, proteinele SMC intră în constituţia unor complexe multiproteice, numite condensine[13] (Caseta 2.3), care la începutul profazei

CASETA 2.3

Rolul coezinelor şi condensinelor în organizarea supramoleculară a cromatinei

***Coezinele şi condensinele** sunt complexe multiproteice care au roluri majore în organizarea supramoleculară a cromatinei şi cromozomilor atât în cursul interfazei, cât şi în mitoză şi meioză. Ambele complexe conţin proteine din familia SMC (structural maintenance of chromosomes) care au activitate ATP-azică.*

*Pe lângă proteinele SMC1 şi 3, **coezinele** conţin RAD21 şi STAG1/STAG2 în cazul complexelor mitotice, sau REC8 şi STAG3 în cazul complexelor meiotice. Principalul rol al coezinelor este acela de a menţine împreună cromatidele surori din faza S a ciclului celular până în metafază când majoritatea coezinei este eliminată, cu excepţia centromerelor. În anafază, securina, un inhibitor al separazei este hidrolizată. Aceasta permite activarea separazei, care va cliva proteolitic RAD21 (REC8), permiţând separarea şi segregarea cromatidelor surori de către microtubulii fusului de diviziune. În cursul interfazei, coezinele sunt implicate de asemenea în procesele de formare a bluclelor laterale ale cromatinei, în special în cooperare cu proteina CTCF (o proteină din familia factorilor de transcripţie cu degete de zinc – vezi capitolul 4). Mutaţii ale genelor SMC1A şi SMC3 au fost implicate în etiologia sindromului Cornelia de Lange.*



*Există două tipuri de **condensine** care conţin, pe lângă proteinele SMC2 şi SMC4, proteine cu activitate reglatorie diferite. Rolul celor două tipuri de condensine este diferit în cursul ciclului celular. Condensina II este prezentă în nucleu în cursul interfazei şi este implicată în stadiile iniţiale de condensare a cromozomilor din cursul profazei mitozei. Pe de altă parte, condensina I este localizată în citoplasmă în cursul interfazei, dar intră în nucleu la sfârşitul profazei. În cursul prometafazei şi metafazei ambele complexe contribuie la condensarea cromozomilor. Cele două complexe rămân de asemenea asociate cromozomilor după separarea cromatidelor surori în anafază.*

12. Datorită elasticităţii acestor proteine, lungimea unui cromozom poate fi mărită de 1.000 de ori fără a se rupe.
13. Fiecare complex de *condensină* conţine un heterodimer de proteine SMC: SMC2 şi SMC4 – proteine cu activitate ATP-azică, alături de alte proteine reglatoare; complexul de condensină estse distrus la sfârşitul metafazei, permiţând separarea şi segregarea cromatidelor surori.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

produc puternica spiralizare şi condensare a fibrei pliate în bucle laterale, ce se transformă în **cromatida** unui cromozom (figura 2.13). Astfel, se asigură o compactare de 20:1, iar prin continuarea condensării cromozomul metafazic atinge o grosime de 700 nm, gradul maxim de compactare a fibrei de bază a cromatinei (30 nm). Fiecare cromatidă a unui cromozom conţine deci *o singură moleculă de ADN*, organizată în mai multe structuri succesive şi ierarhizate de „împachetare". La sfârşitul diviziunii, *în telofază*, se produce despiralizarea/decondensarea cromozomilor.

Relaţia dintre ADN, fibrele de cromatină şi cromozomi se poate reda sintetic astfel:

ADN	→	Filament cu nucleozomi	→	Fibră de cromatină	→	Cromatida unui cromozom
		Interfază				Diviziune

Moleculele de ADN suferă astfel o *compactare de 10.000 de ori* şi pot încăpea cu uşurinţă în spaţiul mic, de circa 10μm diametru, al nucleului. Acest fenomen *favorizează distribuţia corectă a materialului genetic* în diviziune şi asigură funcţionarea ADN.

În concluzie, organizarea supramoleculară a ADN are rol structural şi funcţional. Din punct de vedere structural, condensarea fibrelor are un rol major în *segregarea corectă* a cromozomilor în diviziune. Rolul funcţional este legat de *reglarea spaţială şi temporală a expresiei genelor*. Astfel, la nivelul diferitelor situsuri formate la nivelul solenoidului sau buclelor de cromatină se pot fixa proteine reglatoare ce intervin în transcripţie şi replicare. Pe de altă parte, plierea fibrei de cromatină în bucle laterale pune în contact regiuni de ADN îndepărtate fizic, făcând posibile interacţiunile dintre elementele reglatoare genice şi secvenţa centrală a acesteia.

3. Cromozomii umani

La începutul diviziunii, cromatina se organizează în **cromozomi**, organite nucleare care fixează intens coloranţii bazici („*chroma*" – culoare; „*soma*" – corp) şi îndeplinesc două funcţii importante:

- *transportă materialul genetic* de la părinţi la descendenţi (prin gameţii formaţi în meioză), precum şi de la o celulă „mamă" la celulele „fiice" (prin mitoză), în cursul multiplicării celulare, asigurând *transmiterea fidelă a informaţiei ereditare*;
- realizează *amestecul materialului ereditar* între generaţii succesive, prin procesele de recombinare ce au loc în meioză, sursa principală de variabilitate.

Anomaliile de număr şi structură ale cromozomilor sunt implicate în numeroase stări patologice (vezi capitolul 11) şi, de aceea, explorările citogenetice reprezintă o *metodă importantă de diagnostic* în medicina clinică (sindroame plurimalformative, debilităţi mintale şi tulburări de comportament, tulburări de sexualizare şi reproducere, cancer). Orice medic practician trebuie să aibă cunoştinţe precise despre metodele de studiu, indicaţiile şi limitele analizei cromozomiale, precum şi priceperea de a interpreta corect rezultatele explorărilor citogenetice.

3.1. Morfologia cromozomilor umani

Numărul şi morfologia cromozomilor sunt elemente caracteristice pentru fiecare specie. La om, în celulele somatice diploide, există în mod normal 46 de cromozomi, iar în gameţi (celule haploide) doar 23 de cromozomi. După fecundare, la zigot se reface numărul diploid şi se realizează 23 perechi de **cromozomi**. La ambele sexe, 22 perechi de cromozomi sunt identici ca mărime, formă şi conţinut genic[14], dar diferiţi ca origine **(cromozomi omologi)** şi se numesc **autozomi**; o pereche diferă însă la cele două sexe, numindu-se cromozomi sexuali sau **gonozomi**: XX la femeie şi XY la bărbat. Cromozomii X şi Y sunt omologi doar ca origine şi funcţie, ambii având un rol important în determinismul sexelor; ei se deosebesc morfologic (cromozomul Y fiind mult mai mic decât cromozomul X) şi genetic (cromozomul X are şi gene „ne sexuale" ce determină diferite caractere ale corpului).

Stadiul optim pentru studiul cromozomilor este *metafaza* sau *prometafaza* mitozei (figura 2.15) deoarece se află în acelaşi plan (formează „*placa ecuatorială*") şi sunt bine individualizaţi. În aceste stadii cromozomii sunt bicromatidieni[15], fiind alcătuiţi din două elemente morfologice longitudinale numite *cromatide surori*, unite la nivelul *centromerului* şi delimitate la capete de *telomere*.

a) Elementele morfologice şi funcţionale comune tuturor cromozomilor sunt: cromatidele,

14. Cromozomii omologi au aceleaşi tipuri de gene (loci omologi), în aceeaşi ordine, dar în acelaşi locus ei pot avea forme identice sau diferite ale genelor alele.
15. Cromozomii metafazici sunt bicromatidieni deoarece în faza S a ciclului celular a avut loc dublarea (replicarea) materialului genetic.

BCU "I. C. BRĂTIANU" LIBRARY

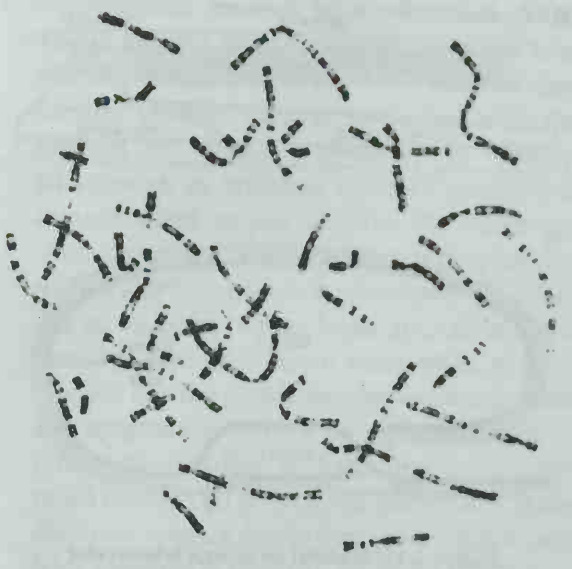


Figura 2.15. O metafază cu marcaj cromozomial R

centromerul şi telomerele. Ele sunt *esenţiale* pentru replicarea şi distribuţia cromozomilor în diviziune; de aceea, ele nu pot lipsi din structura unui cromozom funcţional sau din arhitectura cromozomilor „artificiali" (YAC, HAC)[16] care sunt „fabricaţi" în scopuri experimentale (vezi capitolul 5).

(1) Cromatidele unui cromozom sunt subunităţi longitudinale identice („cromatide-surori") constituite fiecare dintr-o *singură moleculă de ADN* asociată cu proteine sau, mai exact, o fibră de cromatină puternic condensată (figura 2.13). În lungul cromatidelor există *secvenţe de replicare autonomă* (elemente ARS), bogate în AT, în care se iniţiază replicarea. Localizarea lor nu a fost încă precis definită la om.

(2) Centromerul este locul în care cromatidele surori sunt ataşate, prin intermediul unui complex multiproteic, formând *constricţia primară*. Cromozomii au în mod normal *un singur centromer*, a cărui poziţie este determinată prin *mecanisme epigenetice*, deoarece cromozomii „fii" vor asambla centromerul în acelaşi loc ca şi cromozomii „parentali".

Centromerul împarte cromatidele în **două braţe**, notate convenţional cu **p** (de la fr. *„petit" = mic, scurt*) pentru braţul scurt şi **q** (litera următoare în alfabet), pentru braţul lung. Raportul dintre lungimea braţului scurt şi lungimea totală a cromozomului defineşte indicele centromeric: Ic=p/(p+q). După poziţia centromerului, stabilită prin indicele centromeric cromozomii pot fi (figura 2.16):

- **metacentrici** – cu centromerul în regiunea centrală a cromozomului şi braţele aproximativ egale (Ic = 0,35-0,50);
- **submetacentrici** – cu centromerul în afara zonei centrale şi braţele de lungimi diferite (Ic = 0,25-0,35);
- **acrocentrici** – cu centromerul spre un capăt al cromozomului (Ic = 0,15-0,25).

Centromerul conţine secvenţe specifice de ADN înalt repetitiv numit **ADN α-satelit** (sau *alfoid*)[17] similar la toţi cromozomii; ele formează un bloc de heterocromatină constitutivă, evidenţiat prin **marcajul C**. La aceste *secvenţe comune* de ADN se adăugă, în regiunea juxtacentromerică, *secvenţe specifice fiecărui cromozom*, reprezentate de ADN β satelit şi ADN satelit 1, 2 sau 3 – în proporţii caracteristice. Heterocromatina centromerică (circa 10 Mb) este esenţială pentru recrutarea complexului de **coezine** care mediază

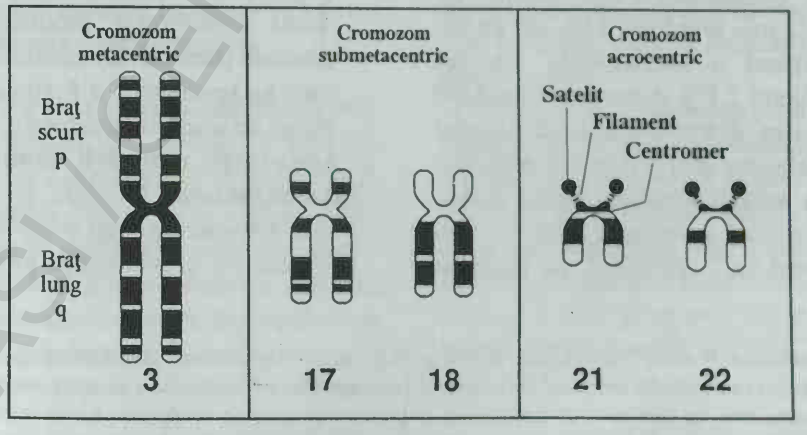


Figura 2.16. Morfologia cromozomilor umani

16. YAC („*yeast artificial chromosome*") – cromozom artificial de drojdie; HAC („*human artificial chromosome*") – cromozom artificial uman.
17. ADN centromeric α-satelit are o lungime de 300-5.000 kb şi conţine secvenţe de 171 pb, repetate în tandem de zeci sau sute de ori.

BCU IAŞI / CENTRUL UNIVERSITAR

adeziunea cromatidelor surori, după replicarea ADN până la separarea lor în anafază.

La secvențele centromerice de ADN satelit se fixează proteine specifice, CENP și CLIP[18] și formează în mitoză o structură specială numită **kinetocor** pe care se atașează filamentele (microtubulii) fusului de diviziune. Kinetocorul este și un element de semnalizare[19] pentru controlul progresiei mitotice a ciclului celular (protejând celula contra pierderii de cromozomi).

Centromerul este elementul esențial pentru *segregarea* (separarea) normală a cromatidelor/cromozomilor în mitoză și meioză. El îndeplinește mai multe funcții: *adeziunea cromatidelor surori, diviziunea celulară* (prin formarea kinetocorului, alinierea cromozomilor în placa ecuatorială și separarea anafazică a cromatidelor) și *împerecherea cromozomilor omologi* în profaza meiozei. Funcționarea incorectă[20] a centromerului poate genera, prin nedisjuncție mitotică, anomalii de număr ale cromozomilor și clone anormale implicate în cancer și îmbătrânire.

(3) Telomerele sunt structuri specializate, formate dintr-un complex de ADN repetitiv și proteine, care „sigilează" capetele liniare ale cromozomilor, asigurând stabilitatea lor și prevenind fuziunea „*cap la cap*" a cromozomilor.

Telomerele au următoarele funcții:

- **Menținerea stabilității și integrității structurale a cromozomului.**

  ADN telomeric este format, la toți cromozomii, prin repetiția în tandem a unui hexanucleotid 5'-TTAGGG-3' pe o catenă (bogată în G) și a secvenței complementare 3'- AATCCC-5' pe cealaltă (bogată în C)[21]; datorită replicării incomplete a telomerelor (vezi capitol 6), catena „G" este mai lungă (cu 150-200 de nucleotide) formând *o proeminență monocatenară 3'* (figura 2.17). Această conformație a ADN ar putea determina oprirea ciclului celular și declanșarea unor procese de reparare; pentru a evita această situație, capătul monocatenar „se ascunde" fixându-se la o secvență scurtă a catenei „C", formând un segment

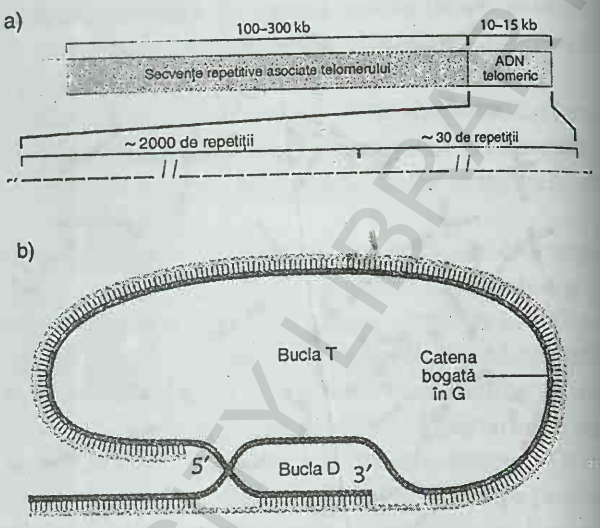


Figura 2.17. Modelul structurii telomerelor
(modificat după Strachan și Read, 2010)

a. Catena 5'→3' (bogată în G, datorită repetiției 5'-TTAGGG-3') se extinde dincolo de catena 3'→5' (bogată în C, datorită repetiției complementare 3'-AATCCC-5');
b. Prelungirea monocatenară 3' se pliază spre regiunea bicatenară (formând bucla T) pătrunde între cele două catene, se fixează complementar pe catena bogată în C deplasând cealaltă catenă (bucla D)

tricatenar sau „o buclă de deplasare" (bucla-D); concomitent, un segment din ADN telomeric bicatenar (ce precede proeminența monocatenară) „se îndoaie" formând bucla-T. Ambele structuri (bucla T și bucla D) sunt „acoperite" de un complex de proteine specifice (numit „*shelterin*" sau „*telozom*") ce formează un fel de „calotă" care stabilizează și protejează capetele cromozomului de degradare, împiedicând fuziunea cu alți cromozomi. Pierderea telomerelor produce capete cromozomiale (fără calotă) instabile sau „lipicioase", care au tendința de a fuziona și forma diferite tipuri de aberații structurale.

- **Asigurarea replicării complete a capetelor cromozomului.** Procesul se realizează cu ajutorul **telomerazei** (un complex ribonucleotidic ce conține o subunitate proteică – TERT, o

18. CENP de la „*Centromere Proteins*" (șase tipuri: A→F) și CLIP de la *Cytoplasmic Linker Proteins*). Proteina CENP-A (o variantă de histonă H3) este probabil markerul epigenetic al centromerului (se fixează la o anumită secvență a ADN satelit-α); ea determină formarea unui tip particular de nucleozom, ce produce un grad de condensare foarte important al ADN-ului în regiunea centromerică.
19. Kinetocorii neatașați la fusul de diviziune generează un semnal pentru oprirea mitozei până ce toți kinetocorii se atașează.
20. Există și o boală „centromerică" – sindromul ICF, caracterizat prin imunodeficiență, instabilitate centromerică și anomalii faciale. Sindromul este produs de o mutație a genei ce codifică ADN-metiltransferaza DNMT3B care conduce la demetilarea citozinei din ADN satelit 2 și 3 producând instabilitate centromerică, vizibilă prin formarea de „cromozomi radiari".
21. După acest „bloc telomeric", spre centromer, se găsește o *regiune subtelomerică* (între 100 și 300 kb), ce conține repetiții de mărime variabilă (numite TAR de la „*telomere associated repeats*"), veritabile „puncte fierbinți" de rupere și reunire, după care urmează secvențele de ADN specifice fiecărui cromozom.

BCU CLUJ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

transcriptază inversă, şi o subunitate ARN-TERC ce este complementară repetiţiei telomerice). Enzima este activă în celulele germinale, celulele stem şi unele leucocite dar *absentă în celulele somatice*. În absenţa telomerazei, ca urmare a replicării incomplete, celulele pierd treptat o parte din secvenţele telomerice. *Scurtarea constantă şi progresivă a telomerelor*[22] va deveni la un moment dat critică (nu se va putea forma bucla şi „calota" telomerică), telomerele devin vulnerabile, şi se va produce oprirea proliferării, senescenţa celulară sau apoptoza (pentru a se evita pierderea de informaţie genetică şi instabilitatea cromozomială corelată cu producerea cancerului). Acest fenomen explică durata limitată de viaţă a celulelor somatice în cultură („limita lui Hayflick" = 50-70 diviziuni). Aşa cum vom vedea (capitolul 6), fenomenul de scurtare a telomerelor este implicat în *senescenţă*, *cancer*, unde se produce o reactivare a telomerazei şi celulele se pot divide nelimitat, devenind „nemuritoare" („imortalizare") dar şi a unui grup nou de „sindroame cu scurtarea telomerelor".

- **Stabilirea arhitecturii tridimensionale a nucleului** şi iniţierea *sinapsei corecte a cromozomilor omologi* la începutul **profazei meiozei I**.

Spaţiul delimitat de către dubla membrană nucleară în nucleul interfazic este împărţit în regiuni numite *teritorii cromozomiale*. Fiecare din aceste regiuni este ocupată de un singur cromozom şi este bine delimitată. Poziţiile relative ale teritoriilor cromozomiale sunt însă *dinamice*, variind în funcţie de tipul şi activitatea celulei, însă constante pentru acelaşi tip celular. Telomerele, fixând cromozomii pe faţa internă a membranei nucleare, reprezintă un element important în stabilirea acestei organizări

În încheiere, pentru a sublinia importanţa telomerelor, vom menţiona că Elizabeth Blackburn, Carol Greider şi Jack Szostak au primit în anul 2009 Premiul Nobel pentru descoperirea mecanismelor prin care telomerele protejează capetele cromozomilor şi descrierea rolului telomerazei. Aşa cum vom vedea în capitolul 18 această descoperire are deja aplicaţii practice în tratamentul bolii canceroase.

b) Elemente morfologice comune *unor* cromozomi

(1) Sateliţii. Cromozomii acrocentrici (exceptând Y) au ataşate la braţele scurte mici mase de cromatină numite *sateliţi* (conţin ADN înalt repetitiv). Ataşarea sateliţilor la regiunea pericentromerică se face prin intermediul unei *regiuni mai decondensate* ce conţine genele pentru ARN ribozomal. În interfază aceste regiuni sunt localizate la nivelul nucleolului şi de aceea se numesc şi *organizatori nucleolari*.

(2) Constricţiile secundare (notate convenţional cu „h") se găsesc pe braţele lungi ale cromozomilor 1, 9 şi 16 lângă centromer; ele sunt alcătuite din ADN repetitiv.

(3) Situsurile fragile. Uneori[23], în anumite regiuni de pe cromatidele cromozomilor, se pot observa „lacune sau constricţii", zone de rezistenţă scăzută, numite *situsuri fragile comune* (SFC). Ele sunt localizate în regiuni cu o structură cromatiniană specifică (mai compactă prin hipoacetilarea histonelor), care se pot rupe spontan *in vivo* sau în anumite condiţii de cultură. Situsurile fragile comune (până în 2009 au fost descrise 89 de SFC) sunt considerate *elemente structurale normale ale cromozomilor* şi se găsesc la toţi sau aproape toţi oamenii. Studii recente sugerează că unele situsuri comune ar putea avea un rol în progresia tumorală: rupturile în aceste situsuri produc inactivarea unor gene supresoare de tumori (de exemplu, situsurile fragile FRA3B[24] sau FRA16D asociate genelor *FHIT* şi respectiv *WWOX*).

Alte situsuri fragile, numite *situsuri fragile rare* au o frecvenţă populaţională redusă (sub 5%), sunt alcătuite din repetiţii di- sau trinucleotidice şi sunt considerate polimorfisme cromozomiale, adesea cu caracter familial. Ele sunt adesea susceptibile la rupere spontană în cursul replicării, afectând frecvent genele vecine.

Clinic, cel mai important situs fragil este *FRAXA*, situat pe braţul lung al cromozomului X (Xq27.3), asociat cu *sindromul X fragil*, cea mai frecventă cauză de retard mental ereditar. De remarcat faptul că acest situs fragil este patologic. El apare ca urmare a expansiunii tripletului CGG în regiunea 5' a genei *FMR1* şi nu este inclus în categoria situsurilor fragile comune sau rare.

22. Lungimea telomerelor la nou-născuţi este de circa 8-10 Kb; la fiecare replicare se pierd 30-200 pb, astfel că la vârstnici telomerele au doar 1.500 pb. Există un grup de boli telomerice (produse de mutaţii ale proteinelor ce formează complexul *„shelterin"* sau se asociază cu telomeraza) în care se constată o pierdere mult mai importantă a telomerelor la fiecare replicare.
23. Situsurile fragile pot fi evidenţiate în culturi de limfocite la care se adaugă substanţe care inhibă parţial replicarea ADN: antifolaţi; *aphidicolin* – un inhibitor specific al ADN polimerazei; bromodezoxiuridină; distamicină.
24. Există două sisteme de nomenclatură a situsurilor fragile; de exemplu, situsul fragil de pe braţul lung al cromozomului X este numit FRAXA de la FRA – situs fragil; cromozomul X – pe care se observă; ordinea descrierii A→F) sau fra(X)(q27.3) de la fra – situs fragil, (cromozomul), (banda/sub-banda).

c) Benzile cromozomiale, elemente specifice fiecărui cromozom

Prin diferite tratamente (digestie enzimatică, denaturare termică etc.) şi/sau încorporarea unor coloranţi specifici pentru ADN (Giemsa, Quinacrină etc.), cromozomii metafazici apar alcătuiţi dintr-o *serie continuă de benzi transversale*, în care zone intens colorate alternează regulat cu altele, mai slab colorate. Fiecare cromozom are *un model caracteristic* al poziţiei, succesiunii, mărimii şi intensităţii benzilor, ce permite identificarea sa precisă (figura 2.18). Acest model este *identic* în toate celulele corpului şi la toţi indivizii speciei. Mărimea benzilor este cuprinsă între 5 şi 10 Mb.

Benzile sunt markeri citologici ai *structurii interne eterogene* a cromozomilor; ele reflectă în primul rând gradul de compactare (condensare) a fibrei de cromatină în lungul cromozomilor. Benzile se corelează în mare măsură şi cu organizarea funcţională a cromozomilor, deoarece definesc *o distribuţie alternativă a eucromatinei (benzi G şi Q negative sau R pozitive) şi heterocromatinei (benzi G şi Q pozitive sau R negative)*, care posedă proprietăţi diferite (tabelul 2.2).

Benzile G şi **Q** pozitive sunt zone din cromozomi bogate în *heterocromatină*, mai compactate, ce conţin puţine gene active şi se replică tardiv spre sfârşitul fazei S; ele posedă ADN bogat în A-T (55-60%) şi numeroase secvenţe repetitive LINEs.

Benzile R pozitive sunt arii cromozomiale ce conţin *eucromatină*, puţin condensată, cu o mare densitate de gene structurale, active; ADN lor se replică precoce, la începutul fazei S şi este bogat în perechi de baze G-C (60%), cu numeroase secvenţe repetitive SINEs (în special din familia Alu). Conţinutul mare în eucromatină face ca anomaliile cromozomiale care implică benzile R să aibă consecinţe clinice importante.

Benzile C, situate în regiunea centromerică, sunt alcătuite din *heterocromatină constitutivă*. Aceasta se mai găseşte pe braţul lung al cromozomului Y, constricţiile secundare şi sateliţii cromozomilor acrocentrici. Deoarece heterocromatina este lipsită de gene sau genele sunt inactive, modificările structurale în aceste zone nu produc efecte fenotipice.

3.2. Analiza cromozomilor

a) Metode de obţinere a cromozomilor

Analizele citogenetice se pot realiza pe *cromozomii metafazici sau prometafazici*, obţinuţi din celule care se divid rapid în culturi celulare (limfocite, fibroblaşti, celule fetale etc.) sau, în unele cazuri, direct din ţesuturi cu activitate mitotică intensă (măduvă osoasă, trofoblast, tumori).

(1) Metodele citogenetice de rutină folosesc *culturi de limfocite din sângele periferic* (produsul cel mai accesibil pentru studiu).

O probă de 0,5 ml sânge heparinat (recoltată steril) este incubată 48-72 ore (la 37°C) într-un *mediu* nutritiv ce conţine ser uman sau de viţel (pentru a îmbogăţi conţinutul în proteine şi factori de creştere) şi *fitohemaglutinină* (pentru a stimula multiplicarea limfocitelor T). Cu puţin timp înainte de terminarea culturii, mitozele sunt *blocate în metafază cu colchicină*, substanţă ce inhibă formarea fusului de diviziune şi trecerea în anafază. Apoi, mediul este înlocuit cu o *soluţie salină hipotonă*, care „umflă" celulele şi dispersează cromozomii. Urmează etapele de *fixare a* celulelor, de *etalare* pe o lamă

Tabelul 2.2. Caracteristicile benzilor cromozomiale

(modificat după Miller, 1996)

Caracteristici	Benzi R	Benzi Q sau G	Benzi C
Localizare	Braţe cromozomiale	Braţe cromozomiale	Centromere, Yq
Tip de cromatină	Eucromatină	Heterocromatină	Heterocromatină
Tip secvenţe ADN	Unice, unele repetitive	Repetitive, unele unice	Înalt repetitive – ADN satelit
Compoziţia bazelor	Bogate în GC	Bogate în AT	Bogate în AT, unele în GC
Secvenţe repetitive	SINEs	LINEs	ADN satelit
Replicare	Precoce	La mijloc sau la sfârşit S	Tardivă
Transcripţie	Intensă	Redusă	Absentă
Densitate gene Insule bogate în CpG	Numeroase	Puţine	Absente
Tip de gene	Gene comune	Gene specific tisulare	Absente

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

microscopică, de *marcare* (cu una dintre tehnicile curente) şi de *colorare (cu Giemsa)*. Preparatele sunt examinate la microscop, se numără cromozomii (obişnuit 16 metafaze; 32 în cazul suspiciunii unui mozaic cromozomial) şi se analizează morfologia lor. Metafazele selecţionate sunt fotografiate şi cromozomii sunt *decupaţi* din fotografiile obţinute după mărire, *identificaţi* şi apoi aranjaţi, pe baza criteriilor morfologice, în perechi de omologi şi grupe pentru a obţine o **cariogramă**. Se analizează atent morfologia şi modelul în benzi a fiecărui cromozom. Tehnica de analiză cromozomială este *o metodă laborioasă, complexă şi costisitoare*, necesitând o pregătire şi o dotare specială. Această analiză este însă „decisivă" pentru diagnostic şi are avantajul că se „efectuează doar o dată în viaţă". În condiţii obişnuite, un rezultat complet nu poate fi obţinut decât în 1-2 săptămâni. Există însă şi sisteme de prelucrare automatizată şi de analiză computerizată a metafazelor care furnizează rapid şi corect cariotipul celulelor analizate; sunt însă relativ scumpe şi necesită un dialog permanent „om – maşină".

Considerăm că este util să precizăm câteva definiţii utilizate în citogenetică (ICSN 2009): **metafaza** este grupul de cromozomi ce corespunde diviziunii unei celule; **cariograma** este aranjarea ordonată, după criterii bine stabilite, a cromozomilor unei metafaze (figurile 2.19 şi 2.20); **cariotipul** (sau formula cromozomială) este descrierea alfa-numerică a cromozomilor unei cariograme; **ideogramele cromozomiale** sunt reprezentările schematice ale dispoziţiei benzilor cromozomiale (figura 2.18). Foarte frecvent însă, în „jargonul" de laborator, termenul de cariogramă este înlocuit cu cel de cariotip.

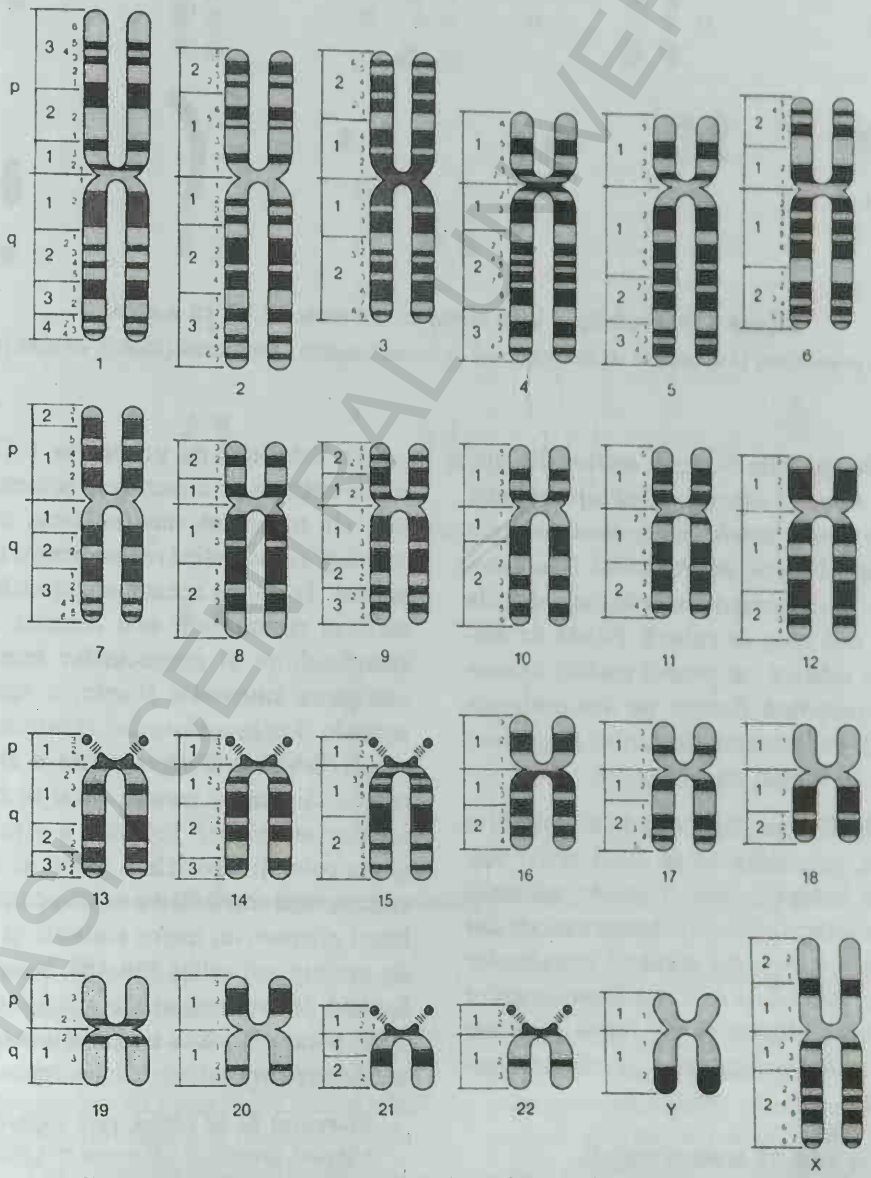


Figura 2.18. Idiograma modelului specific al dispoziţiei benzilor în fiecare cromozom (realizată pe baza marcajului G)

(după ISCN, 2009)

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

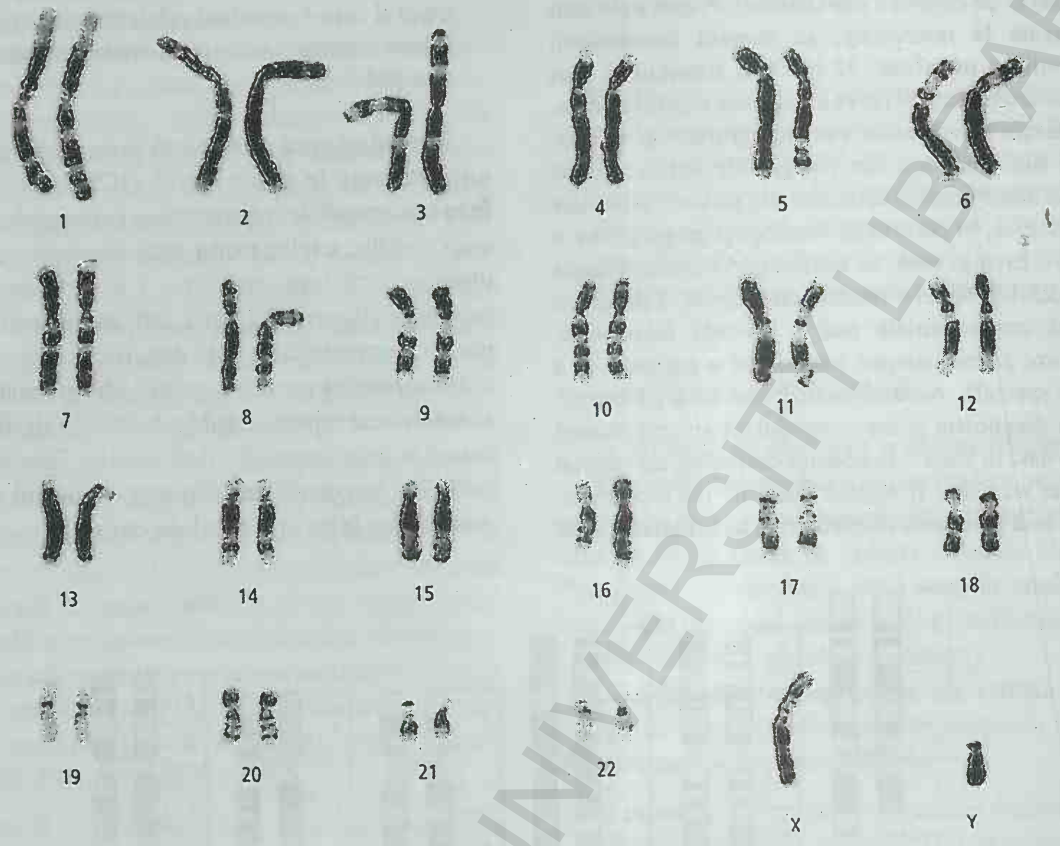


Figura 2.19. Cariotipul unei metafaze normale 46,XY cu marcaj G

Pe unul din cromozomii 16 se observă un bloc mai mare de heterocromatină centromerică (16qh+), variantă polimorfică normală

(2) Metodele speciale folosesc *culturi* din alte tipuri celulare: *măduvă osoasă, fibroblaşti* obţinuţi prin biopsie de piele; *celule fetale* recoltate prin amniocenteză sau biopsie de trofoblast (placentocenteză). Ele au dezavantajul prelevării mai dificile şi al unui timp mai lung de cultură. Există de asemenea *variante tehnice* ce permit studiul cromozomilor în prometafază (bazate pe sincronizarea ciclului celular), evidenţierea situsurilor fragile sau a sindroamelor cu rupturi cromozomiale.

(3) Metodele directe (fără cultură) se aplică, în anumite situaţii, ţesuturilor ce se divid activ: *măduvă osoasă* în leucemii, *tumori solide*, *vilozităţi coriale* (în diagnosticul prenatal). Aceste metode dau rezultate rapide (24 ore), dar numărul metafazelor analizabile este variabil şi calitatea cromozomilor mediocră. Metodele directe se pot folosi şi pentru studiul *cromozomilor meiotici*, mai ales din spermatocite, la bărbat.

b) Tehnici de analiză cromozomială

Din 1956 şi până în prezent, tehnicile de analiză cromozomială au evoluat permanent, putându-se deosebi schematic cinci generaţii de tehnici.

(1) Tehnicile de generaţia I (1956). Cromozomii obţinuţi prin metodele prezentate mai sus şi fără alt tratament sunt *uniform coloraţi* („solid staining") şi au puţine repere pentru identificarea lor precisă. Folosirea actuală a metodelor ce colorează uniform cromozomii este limitată la diagnosticul aneuploidiilor şi mozaicurilor cromozomiale, investigarea situsurilor fragile, a rupturilor cromozomiale şi polimorfismului cromozomial.

(2) Tehnicile de generaţia a II-a (1970) sunt *tehnici de marcaj cromozomial în benzi al cromozomilor metafazici.* Folosind o serie de tratamente şi/sau coloraţii speciale a ADN, se vizualizează pe cromozomii metafazici o structură specifică de benzi alternative, intens colorate şi puţin colorate. Se evidenţiază astfel **300-400 benzi** pentru un set haploid de cromozomi metafazici. (figurile 2.19 şi 2.20) şi caracterizarea majorităţii anomaliilor cromozomiale (exceptând microdeleţiile).

Marcajul G se obţine prin *digestie controlată cu tripsină*, urmată de colorarea cu Giemsa (figura 2.19). Benzile G pozitive sunt intens colorate, iar cele G negative sunt foarte slab colorate Tehnica este relativ simplă şi larg folosită; are dezavantajul că nu

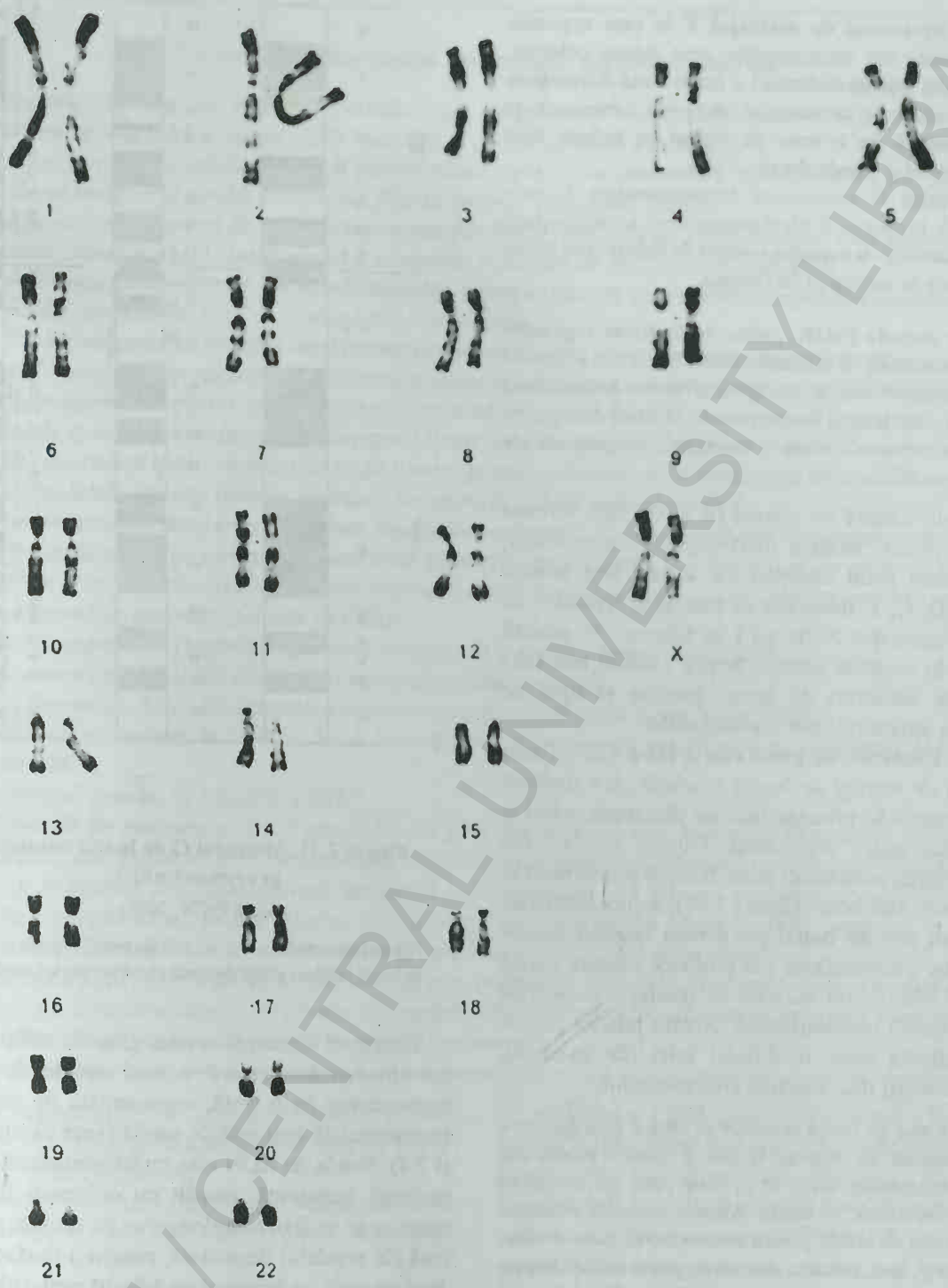


Figura 2.20. Cariotipul unei metafaze normale 46, XY cu marcaj R

colorează telomerele cromozomilor, regiuni frecvent implicate în rearanjări cromozomiale.

Marcajul Q se obţine prin colorarea cromozomilor cu un fluorocrom ce se fixează preferenţial pe regiunile ADN bogate în AT (de exemplu, Quinacrina, DAPI, Hoechst 33258); benzile Q fluorescente (observabile în UV) au aceeaşi distribuţie ca şi benzile G. Metoda are dezavantajul că preparatele nu sunt permanente şi necesită un echipament special de microscopie. Este utilă în special pentru analiza cromozomului Y, evidenţiind zona de heterocromatină de pe braţul lung.

Marcajul R (de la „*Reverse*") are o dispoziţie *inversă* benzilor G sau Q şi poate fi obţinut prin denaturarea termică controlată (85°C) a preparatelor într-o soluţie salină, înaintea colorării cu Giemsa sau prin folosirea unor coloranţi specifici pentru regiunile bogate în GC (de exemplu, *chromomicina A3*); benzile colorate se numesc benzi R pozitive (ele corespund benzilor G sau Q negative) (figura 2.20). Un subset de benzi R

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

este reprezentat de **marcajul T** în care regiunile terminale ale cromozomilor apar intens colorate. Această tehnică realizează o foarte bună diferențiere a benzilor și telomerelor, dar este laborioasă și influențată de o serie de factori ce trebuie bine cunoscuți și standardizați.

Marcajul C evidențiază heterocromatina Constitutivă, în special la nivel centromeric; se obține după denaturarea cu o soluție saturată de hidroxid de bariu, înainte de colorarea cu Giemsa.

Alte metode (NOR, pentru evidențierea regiunilor organizatoare de nucleoli; studiul replicării, în special a cromozomilor X, cu ajutorul bromodeoxiuridinei etc.). sunt tehnici foarte speciale, utilizate doar pentru caracterizarea unor remanieri cromozomiale complexe.

Unele tehnici de marcaj (R și G) sunt folosite curent pentru analiza morfologiei cromozomilor, producând setul complet de benzi; alte tehnici (benzi Q, C, T, metodele de marcaj al replicării cu BrdU, colorația NOR ș.a.) se folosesc în analiză numai în anumite situații, pentru a defini mai bine anumite subseturi de benzi, precum și tipul de aberații structurale ale cromozomilor.

(3) Tehnicile de generația a III-a (1977) sunt *tehnici de marcaj de înaltă rezoluție* care studiază cromozomii în primele faze ale diviziunii, când ei sunt mai puțin condensați. Fiecare bandă[25] din cromozomii metafazici poate fi astfel subdivizată în mai multe sub-benzi (figura 2.21). Se pot identifica **550 sau 850 de benzi** per genom haploid, corespunzător prometafazei sau profazei. Fiecare bandă are ~5 Mb, *limita maximă de rezoluție în analiza citogenetică convențională*. Aceste tehnici permit evidențierea unor modificări mici (de exemplu, microdelețiile) din structura cromozomilor.

Marcajul de înaltă rezoluție se obține prin folosirea tehnicilor de marcaj G sau R pentru procesarea cromozomilor aflați *în primele faze ale diviziunii* (prometafază, profază). Aceasta necesită *blocarea sintezei de ADN*, pentru *sincronizarea* tuturor celulelor și, apoi, reluarea sintezei și oprirea culturii într-un moment în care numeroase celule se află la sfârșitul profazei. Tehnicile de sincronizare ce permit obținerea unei rezoluții de aproximativ 550 de benzi au devenit tehnici de rutină; cele care obțin o rezoluție de 880 benzi sunt rezervate analizei „țintite" a unor regiuni cromozomiale, când se suspectează o anomalie structurală fină (de exemplu, microdelеția unei părți dintr-o bandă cromozomială).

(4) Tehnicile de generația a IV-a (1980) sunt tehnici de citogenetică moleculară.

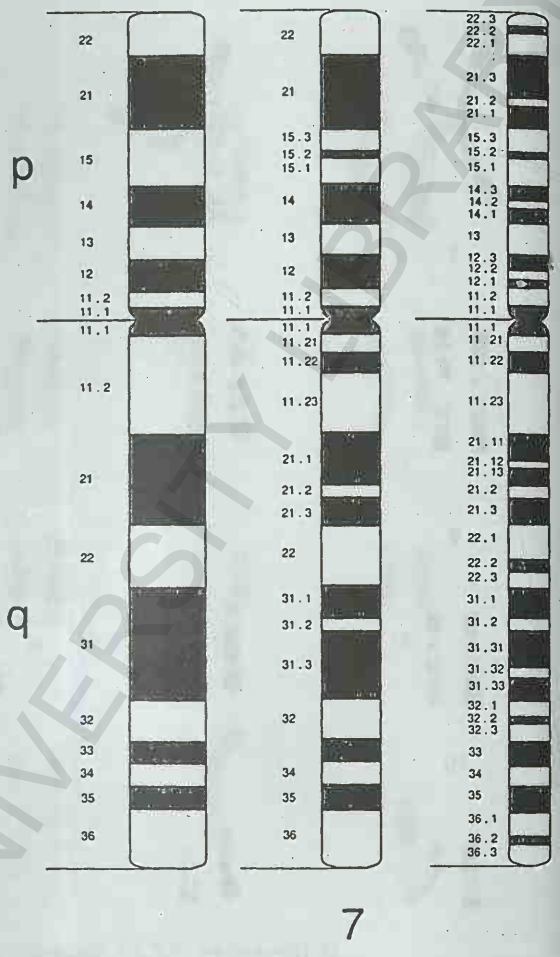


Figura 2.21. Marcajul G de înaltă rezoluție pe cromozomul 7

(după ISCN, 2009)

Nivelul de rezoluție este de 450 de benzi (stânga), 550 de benzi (mijloc) și 850 de benzi (dreapta) per set haploid

Principiul comun al acestui grup de tehnici este *hibridizarea moleculară* a unei **sonde** de ADN monocatenar cu o **țintă**, reprezentată de regiunea cromozomială analizată de sondă (vezi casetele 2.1 și 2.4). Sonda de ADN este un oligonucleotid cu o secvență cunoscută, marcat cu coloranți fluorescenți; ea se va fixa *complementar* pe secvența ADN țintă (în prealabil denaturată, pentru a desface cele două catene); se formează un **hibrid molecular** (un heteroduplex) și sonda hibridizată emite un semnal fluorescent[26] a cărui localizare este determinată la microscop.

Prin tehnicile de citogenetică moleculară se pot identifica aberații cromozomiale (deleții, duplicații și translocații) mai mici decât cele ale unei benzi cromozomiale, sub 5-10 Mb. Tehnicile de citogenetică moleculară sunt complexe și laborioase, necesită dotări speciale și expertiză, costurile pot fi

25. Cercetări recente demonstrează că numai benzile G pozitive/colorate se scindează în sub-benzi.
26. Când este excitată cu o anumită lungime de undă a luminii.

ROMANIAN UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 2.4

Tehnicile de citogenetică moleculară: caractere generale

***Principiul comun** al tuturor tehnicilor de citogenetică moleculară este hibridizarea prin complementaritate între o sondă ADN marcată şi o ţintă de ADN genomic.*

*Fiecare din aceste tehnici poate fi caracterizată prin patru **parametri**: sondele utilizate, ţintele, tehnicile de marcare a sondei şi suportul fizic ce permite realizarea tehnicii.*

***Sonda** este un fragment de ADN monocatenar (de 50-300 nucleotide) complementar unei regiuni din cromozom. Sondele pot fi clasificate în 4 categorii, în funcţie de tipul de secvenţă ADN :*

- ***sonde pan-centromerice** sau **pan-telomerice,** corespunzătoare unor secvenţe repetitive comune mai multor cromozomi, care marchează toţi cromozomii;*
- ***sonde centromerice specifice unui cromozom** (sonde alfoide), corespunzătoare secvenţelor repetitive de ADN α-satelit din regiunile centromerice, caracteristice unui anumit cromozom; pot fi utilizate pe cromozomii metafazici sau cromatina interfazică;*
- ***sonde specifice unui locus dat,** corespunzătoare unor secvenţe unice (gene); pot decela microdeleţii sau microduplicaţii: dacă sonda nu se fixează pe zona cromozomială investigată de sondă (absenţa semnalului) aceasta lipseşte (deleţie), iar apariţia a două semnale indică o microduplicaţie;*
- ***sonde specifice unui cromozom** (sau sondele de „colorare" cromozomială) sunt amestecuri complexe de sonde specifice corespunzătoare unor situsuri de pe un cromozom întreg sau de pe un braţ; în acest grup se includ şi sondele care colorează diferit fiecare din cele 24 tipuri de cromozomi umani sau sondele genomice folosite în CGH.*

***Ţintele** reprezintă fragmentul genomic analizat de o sondă; ţintele sunt multiple:*

- *segmente de ADN din cromozomi metafazici (tehnica FISH);*
- *segmente de ADN din cromatina nucleilor interfazici (în special din celule fetale);*
- *întregul cromozom, în tehnicile de „colorare/pictură cromozomială" („chromosome painting") M-FISH sau SKY;*
- *întregul genom, în tehnicile CGH.*

***Tehnicile de marcare** a sondei pot fi directe, prin încorporarea unui nucleotid fluorescent în sonda sintetizată, sau indirecte, prin încorporarea unui nucleotid modificat ce conţine o moleculă „reporter" (cum ar fi biotina sau digoxigenina), moleculă ce este recunoscută într-o a doua etapă de un ligand specific (streptavidină pentru biotină şi anticorpi specifici pentru digoxigenină) conjugat cu un fluorocrom. De menţionat că există tehnici în care este marcată ţinta şi nu sonda..*

***Suportul fizic** ce permite realizarea tehnicii este, în general, o lamă microscopică, uneori tratată mod special, pe care sunt depuse fie ţintele, fie sondele. Hibridizarea se realizează la interfaţa solid-lichid (ţinta fiind fixată pe suport şi sonda în soluţie sau invers).*

uneori importante, dar sunt performante şi dau rezultate excelente pentru diagnostic, care nu pot fi obţinute cu alte mijloace.

Aplicaţiile tehnicilor de citogenetică moleculară, de generaţia a IV-a, sunt multiple, cele enumerate mai jos fiind uzuale:

- diagnosticul sindroamelor cu microdeleţii/microduplicaţii prin utilizarea de sonde unice specifice regiunilor respective;
- diagnosticul prenatal rapid, fără cultură celulară, al aneuploidiilor, prin FISH pe nucleii interfazici ai celulelor fetale;
- identificarea rearanjărilor subtelomerice implicate în unele forme de retard mintal, prin FISH cu combinaţii de sonde subtelomerice specifice fiecărui cromozom;
- identificarea originii cromozomiale a cromozomilor markeri mici şi precizarea conţinutului lor în eucromatină.

a) Tehnica FISH („*fluorescence in situ hybridization*"– hibridizare fluorescentă *in situ*) foloseşte sonde marcate direct sau indirect cu 1-3 fluorocromi. În această tehnică ţinta o reprezintă cromozomii metafazici sau nucleii interfazici fixaţi pe o lamă microscopică.

- *Tehnica FISH pe cromozomii metafazici* permite detectarea deleţiilor (figura 2.22a), duplicaţiilor submicroscopice sau translocaţiilor: absenţa semnalului fluorescent pe zona cromozomială corespunzătoare sau absenţa sa din nucleul interfazic defineşte deleţia, iar apariţia unui semnal suplimentar indică o microduplicaţie. Tehnica FISH poate decela anomalii segmentare foarte mici (microdeleţii, microduplicaţii, translocaţii criptice sau cromozomi markeri), limita de detecţie fiind legată de mărimea regiunii genomice acoperită de sondă şi de capacitatea sistemului

de detecție de a capta semnalul fluorescent. Limita esențială a tehnicii este reprezentată de numărul restrâns de sonde ce pot fi folosite simultan dar mai ales de faptul că, fiind o tehnică „țintită", prin această metodă *nu vom identifica decât anomaliile pe care le căutam.* Cu alte cuvinte, obținerea unor rezultate optime depinde de indicațiile clinice sugestive pentru *un anumit sindrom plurimalformativ*, pentru diagnosticul căruia vom folosi anumite sonde.

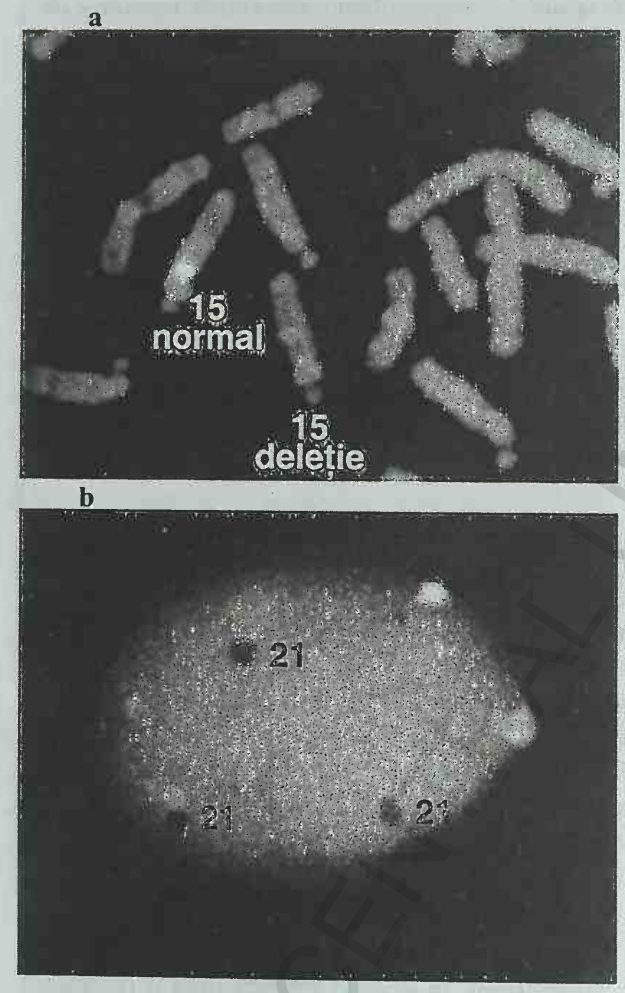


Figura 2.22. FISH pe cromozomi metafazici și în nucleu interfazic

(adaptat după Connor și Ferguson-Smith, 1997)

a) Microdeleția 15q12 în sindromul Prader-Willi; b) FISH interfazic cu sonde pentru cromozomii X, Y, 13, 18 și 21; se observă trei semnale 21, indicând o trizomie 21

- *Tehnica FISH* a extins aplicațiile diagnosticului citogenetic de la cromozomii metafazici la nucleii interfazici. „*Citogenetica interfazică*" se folosește de obicei în diagnosticul prenatal. Hibridizarea unor sonde de ADN (centromerice sau de locus) specifice anumitor cromozomi (cel mai frecvent 21, 18, 13, X și Y) cu nucleii interfazici ai amniocitelor permite diagnosticul prenatal rapid (fără cultură) al aneuploidiilor cromozomilor respectivi, fără a fi nevoie de efectuarea cariotipului (de exemplu, prezența a trei spoturi fluorescente corespunzătoare sondei cromozomului 21 pune diagnosticul de trisomie 21) (figura 2.22.b).

b) Tehnica de „colorare/pictură" cromozomială folosește un amestec de sonde specifice secvențelor unui braț cromozomial sau unui cromozom întreg, obținându-se colorarea integrală („*chromosome painting*") cu un anumit fluorocrom. Dezvoltarea metodei a permis colorarea diferențiată a tuturor celor 24 tipuri de cromozomi umani diferiți (22 autozomi + X + Y). Există două variante tehnice: **M-FISH** sau **SKY**. Ambele tehnici utilizează, pentru fiecare cromozom, combinații specifice de sonde marcate cu până la cinci fluorocromi diferiți. Diferențele între cele două tehnici sunt la nivelul capturii imaginilor (captura secvențială, cu filtre diferite specifice fiecărui fluorocrom pentru M-FISH sau captură unică și analiză a semnalului capturat prin interferometrie, ce permite separarea semnalelor emise de fiecare fluorocrom, pentru SKY-FISH). Analiza informatică a imaginilor permite colorarea virtuală, particulară, unică, a fiecărui cromozom.

Ambele variante tehnice (limita de rezoluție este de aproximativ 5 Mb) permit evidențierea atât a anomaliilor cromozomiale neechilibrate (numerice sau structurale), cât și a anomaliilor cromozomiale echilibrate. Au aplicabilitate limitată și costuri ridicate, fiind folosite în special pentru identificarea remanierilor cromozomiale complexe specifice cancerelor, în care tehnicile de marcaj în benzi sau altele nu sunt suficient de precise.

c) Tehnica CGH („*Comparative Genomic Hybridization*" – *hibridizare genomică comparativă*) este o tehnică de citogenetică moleculară cantitativă care permite analiza *variațiilor numărului de copii* ale unor segmente din ADN al unui pacient cu o boală constituțională sau a ADN al unor celulele tumorale.

La persoanele normale, fiecare segment de ADN se găsește în două copii, câte una pentru fiecare din cei doi cromozomi ai unei perechi de omologi. În unele afecțiuni se poate produce o modificare a numărului de copii care poate crește – în duplicații sau amplificări (în unele forme de cancer acest număr este ≥ 10) –, sau poate scădea, în deleții. CGH permite depistarea acestor modificări și identificarea regiunilor implicate.

Tehnica CGH poate fi definită ca o tehnică de „*colorare cromozomială inversată*". În această

tehnică sondele sunt reprezentate de un genom de referinţă – sub formă de cromozomi metafazici nemarcaţi (fixaţi pe o lamă microscopică), ţinta fiind genomul pacientului (sub formă de ADN) marcat cu un fluorocrom. În reacţia de hibridizare comparativă se folosesc cantităţi egale[27] de ADN provenit de la pacient, marcat în verde cu *fluoresceină*, şi ADN martor (control), de la un individ normal, marcat în roşu cu *rodamină*. Folosind un microscop cu epifluorescenţă şi capacitate de analiză digitală cantitativă a imaginilor (cu un soft specializat) pot fi detectate diferenţele intensităţii de fluorescenţă a celor două „coloraţii" cromozomiale de-a lungul cromozomilor fixaţi pe lamă, care reflectă variaţiile numărului de copii (deleţii sau duplicaţii) în anumite regiuni cromozomiale

ADN marcat, test sau martor, se va hibridiza *în mod competitiv cu ADN al cromozomilor* metafazici: dacă numărul de copii este crescut (duplicaţie) sonda de ADN test, a pacientului (sau din ţesutul potenţial tumoral), marcată în verde, se va hibridiza *preferenţial* pe segmentul cromozomial complementar, care va apărea colorat în verde; dacă numărul de copii este scăzut (deleţie), sonda de ADN normal, marcată în roşu, se va hibridiza preferenţial, iar segmentul corespunzător se va colora în roşu; dacă numărul de copii nu este modificat, cele două sonde se vor hibridiza în cantităţi echivalente şi segmentul cromozomial va apărea colorat în galben portocaliu (figura 2.23).

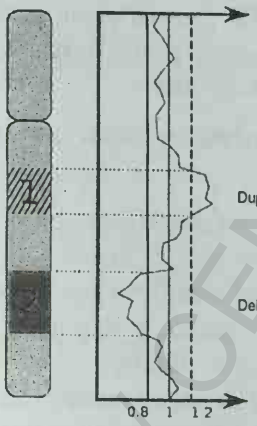


Figura 2.23. CGH pe un cromozom metafazic ipotetic

Se observă (1) regiunea duplicată (semnal „verde" = gri haşurat, în imagine) şi (2) regiunea deletată (semnal „roşu" = negru în imagine)

CGH identifică numai deleţii şi duplicaţii mici, din sindroame plurimalformative sau tumori, care nu pot fi observate pe preparate metafazice; metoda nu are aplicabilitate în detecţia translocaţiilor reciproce echilibrate sau a inversiilor. Nivelul de rezoluţie este de 5-10 Mb, similar cu cel obţinut prin aplicarea tehnicii FISH pentru duplicaţii, şi 1 Mb pentru deleţii; el poate fi crescut folosind *CGH pe microreţele*.

d) Tehnica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* – amplificarea simultană a sondelor ligaturate) este o metodă ţintită de înaltă rezoluţie ce permite detectarea deleţiilor sau duplicaţiilor unor segmente de cromozomi/gene (exoni). MLPA este o variantă *semicantitativă* a tehnicii de PCR (descrisă în subcapitolul 5.A.2) care permite *amplificarea simultană* (multiplex; într-o singură reacţie) a mai multor ţinte[28] (identificate cu sonde ADN diferite), folosind o singură pereche de amorse („*primers*"), deci o singură reacţie.

Fiecare sondă MLPA pentru o anumită regiune genomică este constituită din două oligonucleotide separate care recunosc şi se hibridizează pe situsuri ţintă adiacente din ADN (figura 2.24) Fiecare oligonucleotid este alcătuit din trei componente: (1) o secvenţă scurtă, complementară ţintei; (2) o secvenţă de „umplutură" („*stuffer*") de lungime variabilă, diferită de la o sondă la alta; (3) o amorsă „universală" pentru PCR, marcată fluorescent. Numai când ambele oligonucleotide ce formează o sondă sunt hibridizate pe ţintele lor ele vor fi ligaturate, de către o ADN ligază, formând o sondă „completă". Avantajul „secţionării iniţiale" a sondei MLPA în două părţi (oligonucleotide separate) este că numai sondele complete/ligaturate sunt amplificate prin PCR. Deoarece fiecare amplicon rezultat prin PCR are o lungime unică (datorită secvenţei de „umplutură") ei pot fi separaţi şi identificaţi prin electroforeză capilară. Se obţine o histogramă „de dozaj" a probei test, în care cantitatea relativă de secvenţe amplificate este proporţională cu numărul de copii ale secvenţei ţintă. Prin raportare la un martor normal/de referinţă,

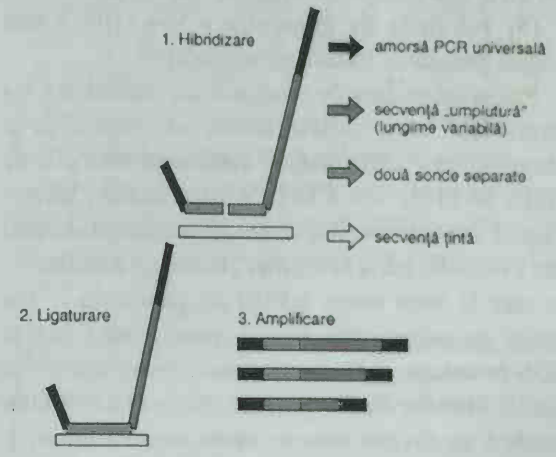


Figura 2.24. Principiul tehnicii MLPA
(adaptat după www.mlipa.com)

27. Se folosesc cantităţi egale de ADN test şi ADN control pentru a suprima efectele secvenţelor repetitive.
28. Maximum 40-45 sonde diferite.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

rezultă o valoare de 1 (dacă sunt prezente ambele alele ale unui locus), 0,5 (dacă lipseşte una din alele) sau 1,5 (dacă există 3 copii ale segmentului ţintă). În practică, se consideră prezenţa unei deleţii dacă raportul este mai mic cu 35-55% comparativ cu normalul, în timp ce duplicaţiile sunt presupuse când raportul este mai mare cu 30-55% faţă de normal.

Principalele aplicaţii ale metodei MLPA sunt:

- detecţia deleţiilor submicroscopice subtelomerice, care cauzează retard mental idiopatic sau diverse anomalii congenitale; comparativ cu tehnica FISH, tehnica MLPA este mult mai facil de aplicat şi are un cost mult mai mic;
- diagnosticul prenatal prin studiul amniocitelor sau celulelor din vilozităţile corionice;
- identificarea duplicaţiilor/deleţiilor unor gene implicate în cancerele umane (precum *BRCA1, BRCA2, hMLH1* sau *hMSH2*);
- analiza metilării ADN ş.a.

Tehnica MLPA are avantajul costului mic, al simplităţii şi sensibilităţii. Principalele limite ale tehnicii MLPA sunt: imposibilitatea detecţiei anomaliilor cromozomiale echilibrate, posibilitatea contaminării cu inhibitori ai reacţiei PCR ş.a., dar mai ales necesitatea confirmării rezultatelor tehnicii MLPA, prin utilizarea metodelor FISH, QF-PCR, RT-PCR.

e) Tehnica QF-PCR (*Quantitative Fluorescent PCR*) este o metodă de analiză a dozajului folosită în *screening*-ul rapid al aneuploidiilor, mai ales în diagnosticul prenatal. Microsateliţii (STR; vezi capitolul 3.C.1) localizaţi pe cromozomii 21, 18 şi 13 (cel mai frecvent implicaţi în trizomiile autozomale) pot fi amplificaţi simultan („multiplex") prin PCR şi astfel pot fi identificate trizomiile prin prezenţa a trei alele sau efectul de dozaj al unei alele.

(5) Tehnicile de generaţia a V-a (1997) sunt tehnici genomice bazate pe microreţele.

Paleta tehnicilor de citogenetică moleculară s-a diversificat foarte mult în ultimii ani, variind de la tehnici „foarte citogenetice" (cum sunt tehnicile de FISH, M-FISH sau CGH) în care analiza microscopică a cromozomilor (manuală sau automatizată) este esenţială, până la tehnici „foarte moleculare" – pe care le vom numi *tehnici de generaţia a V-a bazate pe microreţele (microcipuri)* care folosesc ADN în soluţie şi nu cromozomii (pro)metafazici. Astfel, limitele dintre genetica moleculară şi citogenetică au devenit incerte, unele anomalii cromozomiale (microdeleţii sau microduplicaţii) putând fi diagnosticate la fel de bine într-un laborator de citogenetică sau în unul de genetică moleculară.

Analiza citogenetică bazată pe microreţele[29] poate fi realizată cu diferite tipuri de „platforme", deosebite prin:

- *tipul de reţea*: reţele ce acoperă întregul genom („*genome-wide*"), reţele „ţintite" (pentru anumite regiuni cromozomiale cunoscute sau grupuri de gene) sau o combinaţie a lor;
- *sondele folosite:* polimorfice (ce conţin SNPs), non-polimorfice (oligonucleotide, clone BAC, ADNc);
- *suportul:* sondele pot fi fixate pe un suport solid (reţele produse de companiile Affymetrics, Agilent şi NimbleGene) sau pe micro-sfere (mărgele) (compania Illumina).

Rezoluţia efectivă a platformelor va depinde de *densitatea* sondelor în reţea. De exemplu, Affymetrics SNP 6.0 – conţine 1,8 milioane de sonde corespunzătoare unor markeri polimorfici (SNPs) sau non-polimorfici – are o rezoluţie de 10-20 kb, aproximativ mărimea unei gene, deci de 1000 de ori mai mare decât metodele moleculare ce folosesc cromozomi metafazici (cu rezoluţie de până la 5-10 Mb).

Tehnologiile pan-genomice bazate pe *microreţele* permit detectarea cu o înaltă rezoluţie şi cu un „debit" mare a anomaliilor genomice cantitative de mărimi variabile : de la aneuploidiile ce afectează un cromozom întreg până la dezechilibrele de talie foarte mică („variaţii ale numărului de copii"). Aceste tehnici realizează „*in silico*" o cariogramă virtuală de înaltă rezoluţie ce permite stabilirea unui **cariotip „digital"**, „virtual", sau „molecular".

Analiza genomică poate fi realizată folosind două tipuri de microreţele :

a) Microreţelele cu sonde non-polimorfice (CGH array)

Microreţelele cu sonde non-polimorfice (CGH array) permit *o analiză de înaltă rezoluţie şi debit mare* şi evidenţiază modificări genomice cantitative, de dozaj genic (deleţii şi duplicaţii de mărime variabilă). Sondele folosite sunt de mărime variabilă: 50-150 kb pentru microreţele de tip BAC (a căror utilizare este tot mai limitată) şi 60-70 pb pentru reţelele de tip oligonucleotidic. Această tehnică, datorită caracterului său comparativ, nu permite determinarea numărului absolut de copii în proba test ci numai a numărului relativ în raport cu proba test.

În această metodă, proba test – reprezentată de ADN genomic obţinut de la un pacient, fragmentat şi marcat cu un fluorocrom verde – este cohibridizată cu o probă martor – reprezentată de ADN genomic martor, fragmentat şi marcat cu un fluorocrom roşu. Cele două

29. Aceste reţele au mai fost numite SOMA (*SNP oligonucleotid microarrays*) şi CMA (*chromosome microarrays*).

probe sunt amestecate în cantităţi egale, denaturate şi apoi hibridizate pe o microreţea ce conţine un număr variabil de sonde (de la 3.000 până la 1.000.000 de sonde[30]), corespunzând unei distanţe variabile între sonde, de la 1Mb până la 3 kb. Măsurând (cu ajutorul unui scanner şi a unui program de analiză) intensitatea de emisie a fluorocromilor roşu şi verde pentru *fiecare spot* şi calculând raportul celor două intensităţi se poate determina raportul dintre numărul de copii în proba test comparativ cu numărul de copii în proba martor (considerată având două copii pentru fiecare locus testat) (figura 2.25).

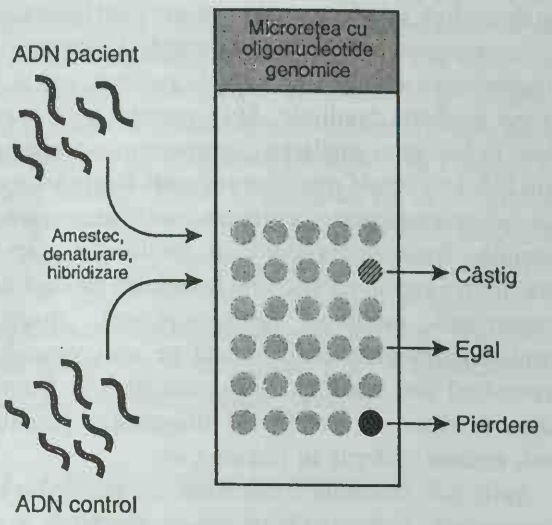


Figura 2.25. CGH array (CGH pe microreţele) (modificat după Nussbaum, McInnes şi Villard, 2007)

b) Microreţelele cu sonde polimorfice de tip SNP

Microreţelele cu sonde polimorfice de tip SNP au avantajul de a oferi, în plus de o informaţie cantitativă similară celei obţinute folosind microreţelele cu sonde non-polimorfice (numărul de copii al unui locus), şi o informaţie calitativă corespunzând genotipurilor locilor polimorfici analizaţi. Astfel, această tehnică poate identifica, în plus de dezechilibrele genomice de tip deleţie/duplicaţie, şi anomaliile fără modificare a numărului de copii („*copy-neutral aberrations*") cum sunt pierderea heterozigoţiei (LOH) şi disomia uniparentală.

ADN extras din proba test este fragmentat, marcat şi hibridizat pe o microreţea alcătuită din sonde oligonucleotidice corespunzătoare celor două alele pentru sute de mii până la câteva milioane de SNP. Programul de analiză determină *intensitatea* semnalului de hibridizare pentru fiecare sondă şi stabileşte: 1) *numărul de copii* pentru regiunea respectivă şi 2) *compoziţia alelică* a markerului polimorf (semnal prezent pentru ambele sonde corespunzătoare celor două alele – heterozigot – sau semnal prezent numai pentru o sondă corespunzând deci unei singure alele – homozigot sau hemizigot). Cunoscând poziţia („adresa") fiecărei sonde în reţea şi adresa fiecărei sonde în genom programul de analiză *aliniază* (ordonează) sondele în ordinea poziţiei lor în cromozom, generând un cariotip de înaltă rezoluţie *in silico* (figura 2.26).

Tehnicile de citogenetică moleculară bazate pe microreţele permit o *analiză cantitativă* de înaltă rezoluţie a *numărului de copii* (CNV) ale ADN la scară genomică; astfel pot fi identificate precis regiuni cromozomiale al căror număr de copii este anormal: deleţii sau amplificări.

Reversul capacităţii de analiză cu mare rezoluţie este identificarea unui număr mare de variaţii ale numărului de copii la indivizii testaţi. Marea majoritatea a acestor variaţii sunt polimorfisme prezente în populaţie, o altă parte sunt variaţii ale numărului de copii „private", specifice individului sau familiei sale, variaţii non patologice, şi doar o mică parte sunt variaţii cu efect patologic. Identificarea variaţiilor patologice necesită : 1) cunoaşterea aprofundată a variaţiilor prezente în populaţie (bazele de date dedicate – *DGV*[31], *ISCA*[32], *CHOP*[33] – sunt de mare utilitate), 2) cunoaşterea anomaliilor deja identificate, a fenotipului asociat şi a conţinutului genic (baze de date ca *DECIPHER*[34], *ISCA* sau ECARUCA[35] cataloghează variaţiile patologice), 3) cunoaşterea funcţiei normale a genelor şi a tulburărilor ce apar când acestea suferă mutaţii.

Tehnicile de citogenetică moleculară bazate pe microreţele au câteva limite majore legate de:

- reprezentarea regiunilor genomice în microreţeua folosită, reprezentare legată de tipul de microreţea folosit (microreţele „ţintite" sau pan-genomice)

30. Sondele sunt produse prin DOP-PCR (pentru microreţelele de tip BAC) sau sinteză directă pe lamă (pentru reţelele de tip oligonucleotidic) şi sunt fie localizate în regiunile deja implicate în rearanjările cromozomice (reţele ţintite, spre exemplu cele propuse de consorţiul ISCA – *International Standard Cytogenomic Array Consortium*), fie distribuite în mod uniform în tot genomul.
31. DGV – Database of Genomic Variants – http://projects.tcag.ca/variation/.
32. ISCA – International Standards for Cytogenomic Arrays – https://isca.genetics.emory.edu/iscaBrowser/.
33. CHOP – Copy Number Variation project at the Children's Hospital of Philadelphia – http://cnv.chop.edu/.
34. DECIPHER – DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Human using Ensemble Resource – http://www.sanger.ac.uk/Postgenomic/decipher.
35. ECARUCA – European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations – http://agserver01.azn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

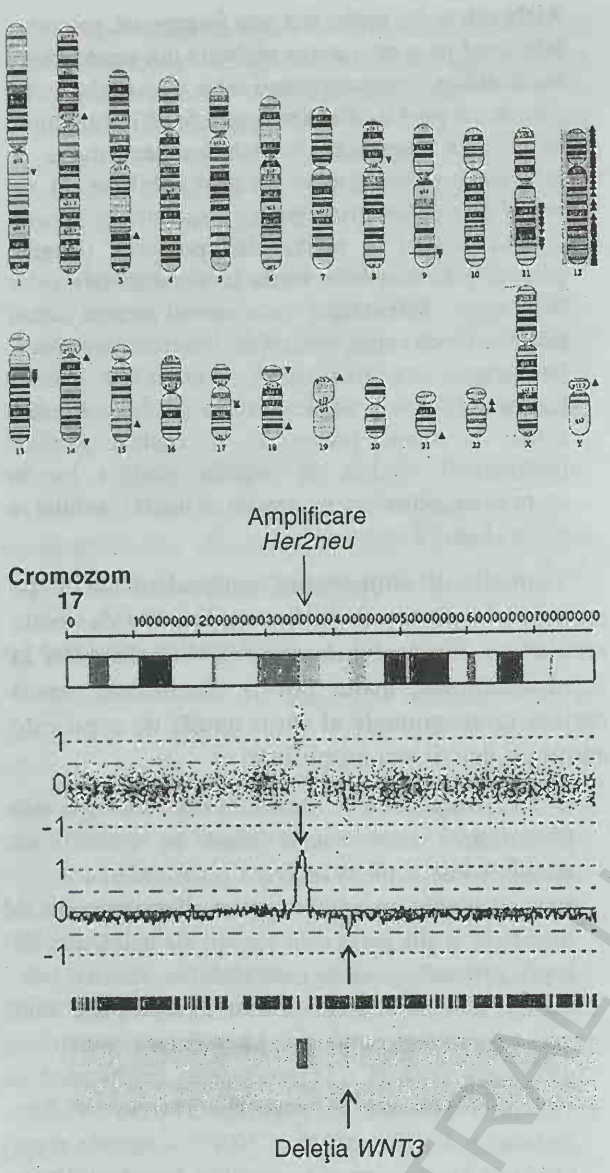


Figura 2.26. Cariotipul digital (prin SNP array): a. într-un caz de leucemie limfocitară cronică (LLC); b. într-un caz de cancer de sân
(după Wikipedia)

a. Idiogramă digitală în LLC: regiunile marcate ▼ reprezintă segmente deletate, iar cele marcate ▲ segmente amplificate; în LLC s-au descris deleție 13q14.3, del 11q22.3, trisomie 12 ș.a.
b. Pe cromozomul 17 se observă regiunile în care este amplificată gena *Her2neu* și deletată gena *WNT3*

și de densitatea sondelor (microrețele de tip BAC cu o rezoluție de 1Mb – din ce în mai rar folosite – față de microrețelele oligonucleotidice a căror rezoluție poate coborî sub 10 kb);

- imposibilitatea detectării anomaliilor cromozomiale echilibrate (inversii, inserții, translocații reciproce) căci extracția ADN cromozomic și fragmentarea lui, etape necesare în realizarea tehnicii, determină pierderea informației poziționale[36];
- imposibilitatea detectării poliploidiilor (triploidiile 69,XXX și tetraploidiile 92,XXXX și 92,XXYY);
- dificultăți în identificarea mozaicurilor celulare cu clone anormale cu frecvență mică (sub 10%), semnalul lor fiind „acoperit" de prezența celulelor normale.

Informația „pozițională" fiind pierdută în acest tip de analiză, tehnici complementare sunt totdeauna necesare pentru caracterizarea completă a anomaliei cromozomice identificate, atât la pacient, cât și în cadrul anchetei familiale. Spre exemplu, în cazul identificării unei duplicații cromozomiale analiza prin FISH cu sonde specifice regiunii duplicate este absolut necesară pentru a preciza localizarea cromozomială a fragmentului duplicat: duplicație „adevărată" (copia suplimentară fiind localizată pe unul din cromozomii omologi corespunzători), inserție (copia suplimentară fiind situată pe un cromozom neomolog) sau translocație dezechilibrată. Consilierea genetică și eventualul diagnostic prenatal sunt, evident, diferite în fiecare caz.

Aplicațiile imediate și valoroase ale tehnicilor de citogenetică moleculară pe baza rețelelor s-au realizat în tumori (pe preparate proaspete sau fixate în formalină) (figura 2.26) deoarece au permis, pe lângă detecția modificărilor „grosiere", identificarea unor deleții mici (ce implică gene supresoare de tumori) sau amplificări ale unor segmente scurte (ce implică oncogene), precum și identificarea secvențelor de ADN viral înserate în genomul uman. Aceasta permit clasificarea moleculară a tumorilor, evaluarea prognosticului și alegerea unei terapii adecvate (de exemplu, *herceptinul* în cazul amplificării Her2/Neu din unele cancere de sân).

Cariotipul digital se poate folosi și în analiza bolilor ereditare și a sindroamelor plurimalformative deoarece poate depista modificări cantitative (microdeleții sau microduplicații) ce nu pot fi identificate prin tehnicile moleculare „convenționale"; în plus, tehnicile bazate pe microrețele nu mai sunt dependente de informațiile clinice prealabile pentru alegerea sondelor, ca în cazul FISH. Practic se produce o veritabilă „revoluție" în practica medicală, marcată de descoperirea unor noi sindroame și revitalizarea citogeneticii clinice, analiza variabilității fenotipice în sindroamele

36. Pentru a depăși handicapul nedepistării anomaliilor echilibrate se „profilează" deja o variantă de analiză numită *„array painting"* bazată pe sortarea cromozomilor și identificarea cromozomilor anormali, cromozomi ce ulterior vor fi hibridizați pe microrețele. Această tehnică este, pentru moment, numai de domeniul cercetării.

BCU "IULIU HAȚIEGANU" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cunoscute[37], identificarea surprinzătoare a incidenţei crescute a mozaicismului (8-10%) şi rearanjărilor cromozomiale constituţionale *de novo* la pacienţi cu retard mental şi dismorfie facială sau cu tulburări neurologice/neuropsihice (unele forme de boală Alzheimer, Parkinson, autism).

Fără a contesta performanţele extraordinare ale tehnicilor de generaţia a V-a vom sublinia totuşi că dotările deosebite (de cele mai multe ori inaccesibile laboratoarelor „clasice" de citogenetică şi relativ „perisabile" prin evoluţia rapidă a „maşinilor" şi microcipurilor), expertiza necesară şi, până la un punct, costurile – limitează introducerea şi folosirea curentă a tehnologiilor de generaţia a V-a. În epoca citogeneticii moleculare („colorată" şi „digitalizată") analiza cromozomilor cu benzi (citogenetica „alb-negru") pe preparate citologice va rămâne, în opinia noastră, foarte importantă; ea va fi „primul pas" în diagnosticul clinic şi va rămâne un timp *„cel mai frecvent test genetic de diagnostic"*. Probabil că totul se va „simplifica" atunci când citogenetica şi diagnosticul molecular se vor „unifica" prin folosirea accesibilă şi la costuri mici a tehnicilor de analiză a întregului genom personal.

3.3. *Clasificarea şi nomenclatura cromozomilor umani*

Identificarea cromozomilor umani se face pe baza morfologiei lor, utilizând criterii precis stabilite la diferite conferinţe internaţionale de standardizare. Clasificarea actuală utilizează *„International System of Human Cytogenetic Nomenclature"* (ISCN, 2009).

Pe baza lungimii şi poziţiei centromerului, cromozomii umani au fost clasificaţi în 7 grupe, notate (convenţional) de la A la G (tabelul 2.3). Autozomii sunt desemnaţi fiecare printr-un număr de la 1 la 22. Se obţine astfel o *aranjare sistematizată a cromozomilor unei celule numită* **cariogramă** (figurile 2.19 şi 2.20).

Identificarea precisă a cromozomilor în cadrul fiecărei grupe nu este posibilă fără ajutorul marcajului în benzi. Modelul de marcaj în benzi G al tuturor cromozomilor umani şi nomenclatura lor sunt prezentate în figurile 2.18 şi 2.27.

La cromozomii cu marcaj în benzi, există în lungul cromatidelor diferite „repere specifice" (centromerul, unele benzi mai importante, telomerele) care împart fiecare braţ în *regiuni cromozomiale*, numerotate pentru fiecare braţ, de la centromer spre telomere (p1, p2, p3...şi q1, q2, q3...). Aceste regiuni sunt divizate în mai multe *benzi*: p11 (unu-unu, nu unsprezece), p12, p13.. (fig. 2.21). Dacă prin tehnici mai fine (prometafază) banda este divizată în *sub-benzi*, ele sunt numerotate ca subseturi ale benzii originale (de exemplu banda 7q31 poate fi divizată în 7q31.1, 7q31.2 şi 7q31.3). La cromozomii profazici pot apărea şi sub-sub-benzi (de exemplu, 7q31.31, 7q31.32, 7q31.33). Conform standardelor internaţionale, fiecare bandă este definită numeric prin numărul cromozomului, braţul, regiunea, banda, sub-banda; de exemplu, Xp21.2 înseamnă sub-banda 2 a benzii 1 din regiunea 2 a braţului scurt al cromozomului X.

Pentru a descrie sintetic un cariotip normal sau anormal ISCN a stabilit un **sistem de nomenclatură** şi o serie de abrevieri. Formula de bază cuprinde 3 itemuri, separate prin virgulă: primul precizează *numărul de cromozomi*, al doilea constituţia (normală/anormală) a *cromozomilor sexuali*, iar al treilea (prezent în funcţie de situaţie) *anomaliile* de număr sau structură ale autozomilor (reprezentate prin abrevierile din tabelul 2.4). Prezenţa unui *mozaic cromozomial* este indicată prin abrevierea *mos* plasată la începutul formulei cromozomiale şi o linie oblică (/) care separă cariotipurile liniilor celulare componente. Prezenţa unui *himerism celular*, ca în cazul grefelor de celule suşă hematopoietice folosite în tratamentul leucemiilor, este indicată prin separarea cariotipurilor clonelor celulare cu două linii oblice (//). Exemple:

46,XX sau 46,XY – cariotip normal feminin sau masculin;

Monosomie X 45,X – 45 cromozomi, un singur cromozom X;

Trisomie 47,XXY – 47 cromozomi cu doi X şi cu un Y;

Tabelul 2.3. Clasificarea pe grupe a cromozomilor umani

Cromozomi	Metacentrici	Submetacentrici	Acrocentrici
Mari	**A** (1-3)*	**B** (4-5)	–
Mijlocii	**E** (16)	**C** (6-12,X)	**D** (13-15)
Mici	**F** (19-20)	**E** (17-18)	**G** (21-22,Y)

* Cromozomul 2 este mai submetacentric.

37. Informaţii în baze de date DECIPHER.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

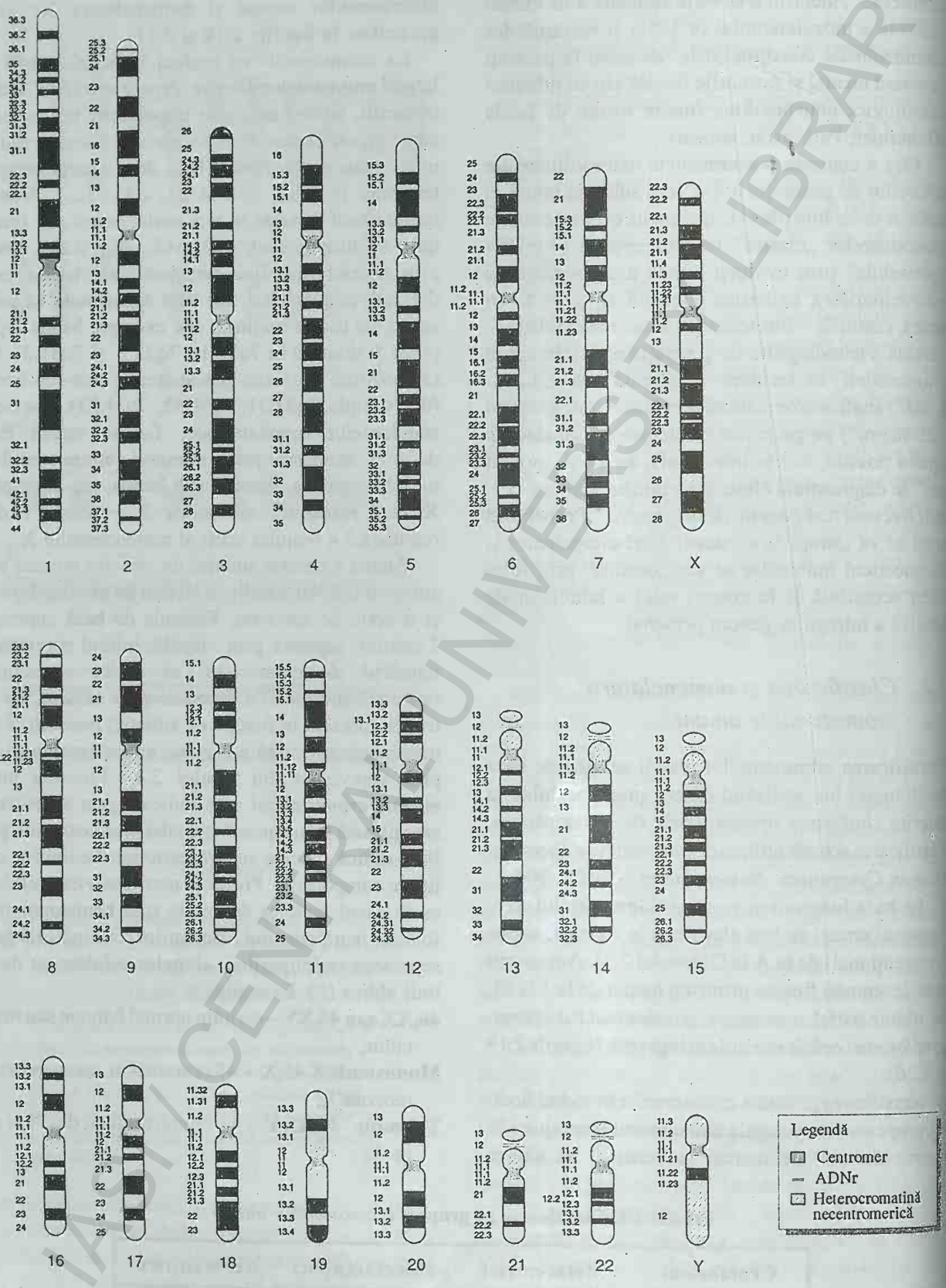


Figura 2.27. Modelul marcajului în benzi a fiecărui cromozom prometafazic şi nomenclatura benzilor
(după ISCN, 2009)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 2.4. Cele mai folosite simboluri în descrierea cariotipului

(după ISCN, 2009)

A-G	grupele cromozomiale	i	izocromozom
1-22	numerele autozomilor	ins	inserţie
X, Y	cromozomii sexuali	inv	inversie
mos	mozaic cromozomial	mar	cromozom marker
/	separă clonele celulare în mozaic	mat	origine maternă
//	separă clonele celulare în himerism	pat	origine paternă
p	braţ scurt	r	cromozom inelar
q	braţ lung	t	translocaţie
pter	capăt braţ scurt	upd	dizomie uniparentală
qter	capăt braţ lung	:	rupere
cen	centromer	::	rupere cu reunire
h	heterocromatină constitutivă	;	separă cromozomii implicaţi
del	deleţie	?	de la ... până la
der	cromozom derivat prin rearanjare	ish	hibridizare *in situ* metafazică
dic	dicentric	nuc ish	hibridizare *in situ* nuclei interfazici
dup	duplicaţie	cgh	hibridizare genomică comparativă
fra	situs fragil	arr	array (microreţea)
+/–	înaintea numărului unui cromozom indică adăugarea/pierderea cromozomului întreg; după numărul şi braţul unui cromozom indică adăugarea/pierderea unei părţi din cromozom/braţ		

Trisomie 47,XX,+21 – 47 cromozomi, la o persoană cu sex genetic feminin şi un cromozom 21 suplimentar (trizomie 21);

Mozaic 45,X/46,XX – mozaic cromozomial cu două linii celulare una cu 45 cromozomi şi un singur X, alta normală – 46,XX.

Pentru a defini mai amplu o anomalie de structură cromozomială (rearanjare), se poate folosi sistemul de numerotare a benzilor şi *precizarea punctelor de ruptură*. Există două forme de nomenclatură: una scurtă – în care se precizează cromozomii implicaţi şi punctele de ruptură; alta detaliată – care identifică punctele de ruptură şi segmentele cromozomiale de la un telomer la altul. În practica medicală, se foloseşte mai ales *sistemul scurt*; cele mai frecvente anomalii de structură (prezentate în capitolul 8) sunt notate astfel:

Anomalii de structură

Deleţie	46,XY,del(5)(p14)
Deleţie terminală	46,XY, del (5)(p14)
Deleţie interstiţială	46,XX,del(5)(p14p15.2)
Duplicaţie	46,XX,dup(1)(q11q32)
Inversie	46,XX,inv(4)(p15q13)
Inserţie	46,XX,ins(6;12) (p21;q13q23)
Izocromozom X de braţ lung	46,Xi(Xq) (q10)
Marker	47,XX,+mar
Cromozom inelar	46,XX,r(18)(p11q22)
Situs fragil	46,XY,fraX(q27.3)
Translocaţie reciprocă echilibrată	46,XY,t(2;8)(p13;q12)
Translocaţie Robertsoniană	45,XX,t(13;14)(q10;p10)

Pentru a exemplifica sistemul detaliat (utilizat de specialişti), redăm nomenclatura a două anomalii de structură prezentate mai sus:

46,XX,inv(4)(pter→q13::q13→p15::q13→qter);
46,XY,t(2;8)(8qter→8q12:: 2p13→2qter;
8pter→8q12:: 2p13→2pter)

3.4. Heteromorfismul cromozomilor

Prin diferite tehnici de studiu s-au evidenţiat variaţii în morfologia unor regiuni cromozomiale la persoane diferite din populaţia generală. Aceste variaţii au fost numite (la Conferinţa Paris, 1971) *heteromorfisme cromozomiale*. Deoarece regiunile cromozomiale heteomorfice sunt arii de heterocromatină, bogate în ADN repetitiv şi inactiv genetic, *mărimea lor variabilă este fără consecinţe fenotipice* („variante normale"). Unele studii relevă totuşi o frecvenţă mai mare a acestor variante heterocromatinice la cuplurile cu avorturi spontane repetate sau în grupul persoanelor cu retard mintal; semnificaţia acestui fenomen este necunoscută.

S-au descris patru tipuri majore de heteromorfisme cromozomiale:

- mărimea variabilă a regiunii heterocromatinice a braţului lung al cromozomului Y: 10% dintre bărbaţii normali au un Yq mai lung (Yqh+) sau mai scurt (Yqh-) decât de obicei;
- mărimea heterocromatinei centromerice (benzi C) sau juxtacentromerice (mai ales la cromozomii 1, 9, 16);
- polimorfismul mărimii sau numărului sateliţilor;
- situsurile fragile induse de antifolaţi (peste 5% din populaţie are 60 tipuri diferite de situsuri).

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

Fiecare persoană posedă un heteomorfism particular (are cel puțin un cromozom marker) ce se transmite nemodificat de la părinte la copil (ca și un caracter dominant), putând fi folosit uneori în determinarea paternității).

Bibliografie specifică selectivă

1. Aubert G, Lansdrop PM. *Telomeres and aging*. Physiological Reviews 2008; 88:557-559.
2. Bejjani BA, Shaffer LG. *Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics*. Annual Rev Genomics Hum Genet 2008; 9:71-86.
3. Bernad R, Sanchez P, Losada A. *Epigenetic specification on centromeres by CENP-A*. Exp Cell Res 2009; 315:3233-3241.
4. Debacker K, Kooy RF. *Fragile sites and human diseases*. Hum Mol Genet 2007; 16:R150-158.
5. Durkin SG, Glover TW. *Chromosome fragile sites*. Ann Rev Genetics 2007; 41:169-192.
6. Edelmann L, Hirschhorn K. *Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies*. Ann N Y Acad Sci 2009; 1151:157-166.
7. Ferguson-Smith MA, Simonic I. *Cytogenetics analysis*. În Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz R.E, Korf BRC (ed.). *Emery and Rimoin Principles and practice of Medical Genetics*. ed. a V-a. Churchil Livingstone – Elsevier, Philadelphia, 2007, 567-600.
8. Gerde T, Kirchhoff M, Lind AM *et al. Computer-Assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13, 18, 21, X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)*. Eur J Hum Genet 2005; 13:171-175.
9. Gilason E, Geli V. *How telomeres are replicated*. Nat Rev Cell Biol 2007; 8:825-838.
10. Heng HHQ, Spyropoulos B, Moens PB. *FISH technology in chromosome and genom research*. BioEssays 1997; 19:75-84.
11. Horn PJ, Peterson LC. *Chromatin higher order folding wrapping up transcription*. Science 2002; 297:1824-1827.
12. ISCN – 2009. În Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ (ed.). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (2009): *Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*.
13. Lyon MF. *X-chromosome inactivation*. Curr Biol 1999; 9:R235-237.
14. Korenberg JK, Mohanadas TK. *Chromosomal Basis of Inheritance*. În Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz R.E, Korf BRC (ed.). *Emery and Rimoin Principles and practice of Medical Genetics*. ed. a V-a. Churchil Livingstone – Elsevier, Philadelphia, 2007, 167-190.
15. Kosyakova N, Weise A, Mrasek K *et al. The hierarchically organized splitting of chromosomal bands for all human chromosomes*. Molec Cytogenetic 2009; 2:4.
16. Miller OJ, Therman E. *Human Chromsosmes*. ed. a IV-a. Springer-Verlag, New York, 2001.
17. Reid T. *Cytogenetics – in color and digitized*. N Engl J Med 2004; 350:1597-1600.
18. Riethman H. *Human telomere structure and biology*. Annual Rev Genomics Hum Genet 2008; 9:1-19.
19. Rosenthal N. *DNA and the genetic code*. N Engl J Med 1995; 331:39-41.
20. Saitoh Y, Laemmli UK. *Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold*. Cell 1994; 76:609-622.
21. Shaffer LG, Bejjani BA. *Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics*. Cytogenet Genome Res 2006; 115:303-309.
22. Shinawi M, Cheung SW. *The array CGH and its clinical applications*. Drug Discov Today 2008; 13:17-18.
23. Slater HR, Bailey DK, Ren H *et al. High-resolution identification of chromosome abnormalities using oligonucleotid arrays containing SNPs*. Am J Hum Genet 2005; 77:709-726.
24. Speicher MR, Carter NP. *The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology*. Nat Rev Genet 2005; 6:782-792.
25. Speicher MR. *Chromosomes*. În Speicher M, Antonarakis SE, Motulsky AE (ed.). *Vogel and Motulsky's Human genetics: problems and approaches*. ed. a IV-a. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010, 55-138.
26. Trask BJ. *Human Cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting*. Nat Genet 2002; 3:769-778.
27. Wang TL, Maierhofer C, Speicher MR *et al. Digital karyotyping*. PNAS 2002; 99:16156-16161.
28. Wood AJ, Severson AF, Meyer BJ. *Condensin and cohesin complexity: the expanding repertoire of functions*. Nat Rev Genet 2010; 11:391-404.

BCU IAȘI UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 3

STRUCTURA GENELOR ŞI A GENOMULUI UMAN

Noţiunea de **genă**, cu denumirea de „factor ereditar", a fost introdusă în biologie de către Gregor Mendel (1865). El a formulat ipoteza potrivit căreia *„o pereche de factori ereditari determină un caracter şi se transmite la urmaşi independent de alţi factori"*. Gena era considerată unitatea de bază a eredităţii, transmisă de la părinţi la descendenţi, în cursul reproducerii. La începutul secolului XX, prin contribuţia a numeroşi geneticieni (Walter Sutton, Theodor Boveri ş.a.) şi în special a lui Thomas Hunt Morgan, se fundamentează **teoria cromozomială a eredităţii**. În acest cadru, *gena*[1] *reprezenta un segment de cromozom* care determină realizarea unui anumit caracter (fenotip). S-au pus astfel bazele **concepţiei clasice** despre *genă, considerată o unitate de structură, recombinare, funcţie şi mutaţie.*

Descoperirea rolului genetic al ADN inaugurează era modernă a geneticii. *Gena devine un segment de ADN care deţine informaţia codificată pentru realizarea unei proteine* (mai exact, pentru aşezarea secvenţială specifică a aminoacizilor în proteină), substratul biochimic al unui caracter[2]. Ulterior, relaţia *„o genă – o proteină"* devine *„o genă – un produs primar specific"* (proteină sau ARN). După 1970, prin folosirea unor metode de analiză directă a ADN, s-a constatat că structura şi funcţia genelor sunt mult mai complexe şi este dificil să se dea genei o definiţie spaţială, structurală şi funcţională foarte precisă. În **concepţia actuală** se consideră că gena este un ansamblu de secvenţe ale ADN necesar pentru producerea unei molecule funcţionale (proteină sau ARN); mai concis, *genă este o unitate de informaţie sau de transcripţie*, fiind alcătuită din secvenţe codante, secvenţe reglatoare şi alte secvenţe funcţionale.

În Proiectul Genom Uman gena a fost definită ca *un segment de ADN care determină un anumit fenotip sau funcţie*; în esenţă, conceptul molecular de genă era centrat pe proteine, iar numărul de gene din genomul uman se referea la „gene ce codifică proteine" (genele ARN erau atunci „prea puţine"). După secvenţierea genomului uman, descoperirea abundenţei genelor ARN şi mai ales caracterizarea elementelor funcţionale ale genomului uman (Proiectul ENCODE) definiţia genei a fost din nou actualizată punându-se accent pe produsul funcţional determinat de genă; astfel: *„gena este o asociere de secvenţe genomice (ce pot fi potenţial suprapuse) care codifică un set coerent de produse funcţionale (proteine sau ARN)" (vezi subcapitolul 3.E.3).*

A. Concepţia clasică despre structura genei

1. Gena – unitate de structură a materialului genetic

În concepţia clasică, *gena reprezintă un segment de cromozom, precis delimitat, continuu (indivizibil), care determină un anumit caracter fenotipic* (figura 3.1).

a) Locus

Gena ocupă în cromozom o anumită poziţie fizică fixă, totdeauna aceeaşi, numită **locus**[3] (plural = loci). Acesta poate fi situat pe autozomi („loci autozomali") sau pe cromozomii sexuali. Cromozomii X şi Y au gene implicate în procesul de sexualizare; cromozomul X are însă şi numeroase alte gene care determină caractere „nesexuale", ca şi locii situaţi pe autozomi

1. Termenul de genă a fost introdus de Wilhelm Johannsen în 1909 (de la cuvântul latin *genus* ce înseamnă şi origine).
2. Relaţia „o genă – un caracter" este mai complexă; vom discuta ulterior acest subiect şi fenomenele de poligenie şi pleiotropie.
3. Termenul de locus este frecvent folosit cu referire la o anumită genă (de exemplu, locusul hemofiliei este situat pe cromozomul X).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(de exemplu, grupa sangvină Xg, vederea colorată, sinteza factorilor VIII şi IX ai coagulării etc.). Cromozomul Y are însă foarte puţine gene „autozomale".

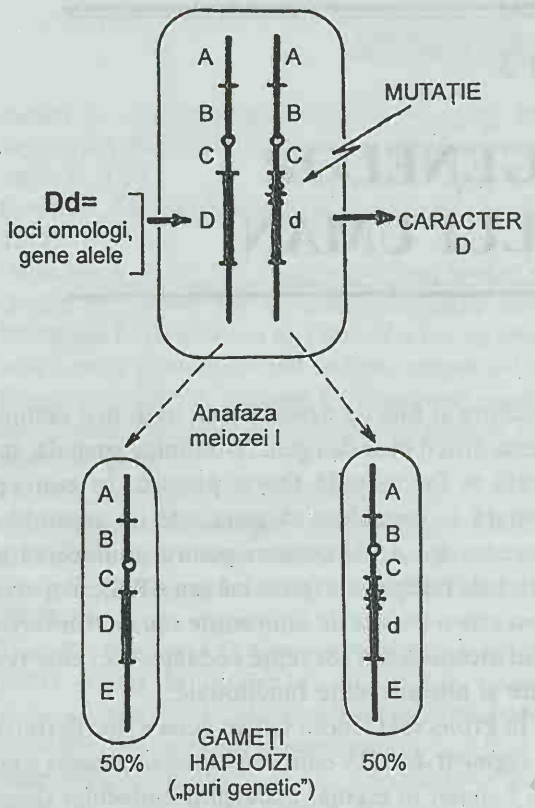


Figura 3.1. Reprezentarea schematică a unei perechi de cromozomi omologi (monocromatidieni) într-o celulă şi a segregării lor în anafaza meiozei I

Genele alele Dd se separă (segregă) în gameţi, iar genele nealele ABCDE, situate pe acelaşi cromozom se transmit în bloc

b) Gene alele. Polialelie

Fiecare genă se găseşte în natură, la indivizii unei specii, într-o formă „standard/tipică", normală sau de tip „sălbatic". Ea poate suferi o mutaţie, care produce o formă alternativă a genei; această *variantă alternativă a genei, ce ocupă acelaşi locus şi influenţează acelaşi caracter se numeşte* **genă alelă** (figura 3.1). O genă (de exemplu, *A*) poate suferi însă mai multe mutaţii diferite (de exemplu, A^1, A^2, A^3... A^n), cu efecte fenotipice identice[4] sau diferite, dar limitate la acelaşi caracter[2]; rezultă *variante alelice* diferite sau **alele multiple**, iar fenomenul se numeşte **polialelie**. Un exemplu clasic îl reprezintă seria de gene alele A1, A2, B şi 0 pentru locusul care determină grupul sanguin AB0. Conceptul de gene alele multiple sau polialelie trebuie înţeles *la nivel populaţional*: o anumită persoană din grup posedă în locusul respectiv numai una din genele alele care există în populaţie. Majoritatea genelor sunt *polimorfice*, cu alele multiple a căror frecvenţă variază de la o populaţie la alta (vezi capitolul 7).

Deoarece în celulele somatice (diploide) cromozomii paterni şi materni formează câte o pereche de omologi, un caracter (monogenic) va fi determinat de o pereche de gene alele[5] ce ocupă loci omologi (de exemplu, *Dd* pentru caracterul D; figura 3.1). Genele alele, situate în loci omologi, *segregă* în anafaza meiozei I, deoarece cromozomii omologi se separă (segregă) şi gameţii devin haploizi (având un singur cromozom din perechea de omologi). Gameţii vor fi astfel *„puri genetic"*, întrucât au o singură genă din perechea de alele. Genele alele situate pe o pereche de cromozomi omologi *segregă independent* de genele alele situate pe altă pereche, formându-se gameţi cu combinaţii genice diferite (figura 3.2).

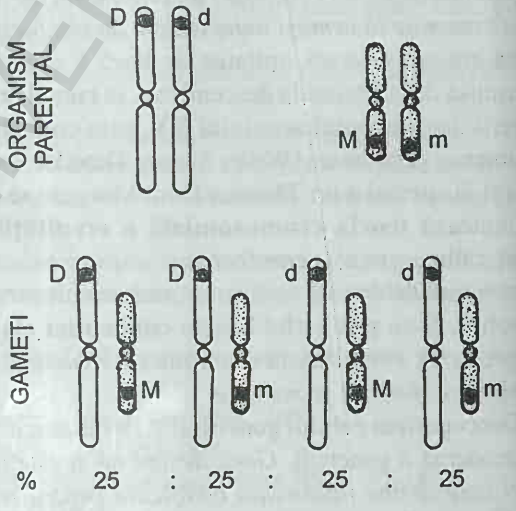


Figura 3.2. Segregare independentă în meioză a două perechi de cromozomi şi a genelor alele Dd şi Mm ce se găsesc pe aceşti cromozomi

Rezultă patru tipuri diferite de gameţi (DM, Dm, dM, dm) în proporţii egale

c) Homozigot, heterozigot, hemizigot

Genele alele (normale – *N* sau anormale – *A*) ce ocupă loci omologi pot fi identice sau diferite. În primul caz (gene alele identice), genotipul[6], ca şi organismul care le posedă este **homozigot** (*NN* sau *AA*), iar în al doilea caz (gene alele diferite) va fi **heterozigot** (*NA*). Frecvent, heterozigoţii au o alelă normală şi una anormală, mutantă (*NA*); ei pot fi însă şi **heterozigoţi compuşi**, cu două alele mutante diferite (A^1A^2). La bărbaţi care posedă doi gonozomi diferiţi, X şi Y, o genă „autozomală" de pe X nu are, de obicei[7],

4. Variantele alelice care au acelaşi efect asupra fenotipului se numesc **izoalele**.
5. Excepţie fac genele „autozomale" de pe X la bărbaţii XY.
6. Noţiunile de genotip şi fenotip se pot folosi şi în sens restrâns, pentru o pereche de gene (*„genotip"*) ce determină un anumit caracter (*„fenotip"*).
7. Excepţie genele pseudoautozomale (vezi capitolul 6.D.2.4)

BUCUREŞTI BIBLIOTECA UNIVERSITARĂ

echivalent pe cromozomul Y; astfel ei au o situaţie deosebită atât faţă de homozigoţii, cât şi de heterozigoţii XX. Pentru această situaţie, în care există o singură genă pentru un caracter, se foloseşte termenul de **hemizigot**.

În cursul meiozei, homozigoţii vor produce un singur tip de gameţi, deci sunt *homogametici*, iar heterozigoţii vor fi *heterogametici*, producând prin segregarea genelor alele două tipuri diferite de gameţi, fiecare în proporţie de 50% (figura 3.1).

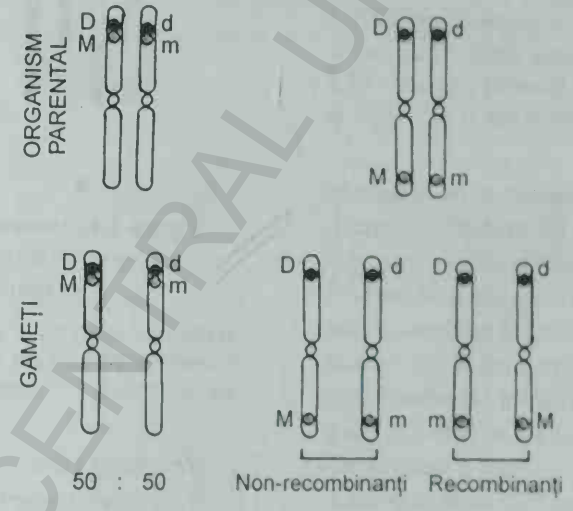
d) Dominant, codominant şi recesiv

La heterozigoţi, genele alele diferite se pot manifesta fenotipic diferit, în funcţie de „forţa" lor de expresie. Acest fenomen va fi analizat în detaliu în capitolul 6, dar pentru moment este util să precizăm câteva elemente importante.

Uneori, una dintre cele două alele diferite este mai „puternică" şi se manifestă fenotipic la heterozigoţi. Gena şi caracterul care se manifestă la heterozigoţi sunt numite **dominante** şi se notează[8] cu o literă majusculă. Gena care nu se manifestă fenotipic la heterozigoţi şi se exprimă numai în stare homozigotă se numeşte **recesivă** şi se notează convenţional cu literă mică. De exemplu, la persoanele cu genotip *Na* gena *N* este dominantă şi fenotipul va fi normal; indivizii respectivi vor fi însă *purtători* ai genei recesive *n*. În acelaşi context, persoanele *An* vor fi fenotipic „anormale"/bolnave, deoarece gena *A* este dominantă, iar gena *n* recesivă. Genele recesive se exprimă însă la homozigoţii *aa* sau *nn*; de aceea, afirmaţia că *„genele recesive nu se manifestă fenotipic"* este eronată. Alteori, ambele gene alele se manifestă fenotipic la heterozigoţi şi vor fi **codominante**. De exemplu, genele *A* şi *B* din sistemul multialelic ce determină grupul sangvin *AB0* sunt dominante faţă de gena 0 şi codominante una faţă de alta; genotipurile *Ao*, *Bo* şi *AB* determină fenotipurile sau grupele sangvine *A*, *B* şi respectiv *AB*. Gradul şi modelul de dominanţă variază la loci diferiţi.

2. Fenomenele de înlănţuire genică (*linkage*) şi încrucişare cromozomială (*crossing-over*)

Un cromozom este alcătuit din mai multe gene nealele, ce ocupă, fiecare, o poziţie fixă (locus). Genele sunt dispuse *liniar* în cromozomi, una după alta sau „în monom" (figura 3.1.), într-o ordine invariabilă, fiind



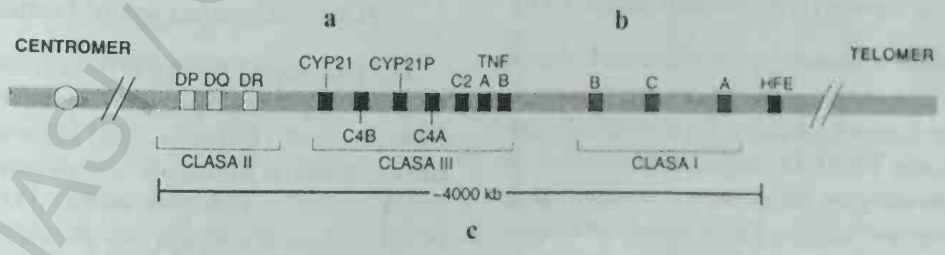


Figura 3.3. Înlănţuirea şi segregarea genelor

a) Segregarea a două gene situate pe acelaşi cromozom foarte aproape una de alta (înlănţuire genică completă); b) Segregarea a două gene situate la distanţă una de alta pe acelaşi cromozom; între ele se poate produce un *crossing-over* meiotic şi pot rezulta gameţi recombinanţi; c) Schema regiunii HLA cu diferite tipuri de gene ce formează un haplotip

8. În sistemul actual de nomenclatură a genelor *simbolul tuturor genelor* se notează cu majuscule şi italic.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

separate prin intervale intergenice de lungimi diferite. Înlănțuirea fizică a locilor aflați pe un același cromozom este definită de termenul **sintenie**.

2.1. *Înlănțuirea genică (*linkage*)*

Genele situate pe același cromozom au tendința de a se transmite de la părinți, prin gameți, la descendenți împreună, „în bloc" (o dată cu cromozomul respectiv). Acest fenomen, în care *genele nealele situate în imediată proximitate pe același cromozom nu segregă* (nu se separă) în meioză și au tendința de a se transmite mai frecvent *împreună* în succesiunea generațiilor se numește **înlănțuire genică** („linkage" în limba engleză) (figura 3.3.a). Genele dintr-o regiune cromozomială care se transmit împreună formează un *grup de înlănțuire* sau un **haplotip**.

Un exemplu clasic îl reprezintă genele din regiunea HLA (~4Mb) situată pe brațul scurt al cromozomului 6, ce cuprinde (figura 3.3.c) genele *HLA* de clasă I (A, B ,C), genele *HLA* de clasă II (DR, DP, DQ), separate de genele *HLA* de clasă III (vezi capitolul 17). În afara genelor implicate în răspunsul imun, în această regiune se găsesc și alte gene „non-imune" care, prin mutații, produc diferite boli: deficiența în 21-hidroxilază sau *sindromul adreno-genital*, prin mutația genei *CYP21* și *hemocromatoza*, prin mutația genei *HFE*; genele respective se transmit strâns înlănțuit cu genele *HLA* din vecinătate: *HLA B* în primul caz și *HLA A* în al doilea caz.

Trebuie să precizăm că fenomenul de înlănțuire se referă la loci și nu la alele. De exemplu, să presupunem că locusul *D* pentru o boală genetică dominantă este înlănțuit cu alt locus *M* (care ar putea fi un marker[9] al locusului morbid); acesta prezintă două forme alelice *M* și *m*. În unele familii alela mutantă *D* este situată pe același cromozom cu alela marker *M* (genotip *DM*) iar în alte familii - cu alela marker *m* (genotip *Dm*); în fiecare caz gena *D* a locusului morbid și alela respectivă a locusului marker se vor transmite împreună, prin gameți, de la părinți la descendenți (figura 3.3.b).

Fenomenul de înlănțuire genică nu este un fenomen absolut deoarece numai genele situate foarte aproape una de alta se transmit totdeauna împreună, înlănțuite (figurile 3.3.a și 3.4.a). În acest caz fenomenul de înlănțuire este *complet*. De exemplu, genele C, D, E ce determină grupul sangvin Rh, localizate pe cromozomul 1, se transmit totdeauna împreună. Pentru genele situate mai la distanță una de alta, pe același cromozom, înlănțuirea genică poate fi *incompletă,* ele putând fi separate prin *crossing-over* (figurile 3.3.b și 3.4.b).

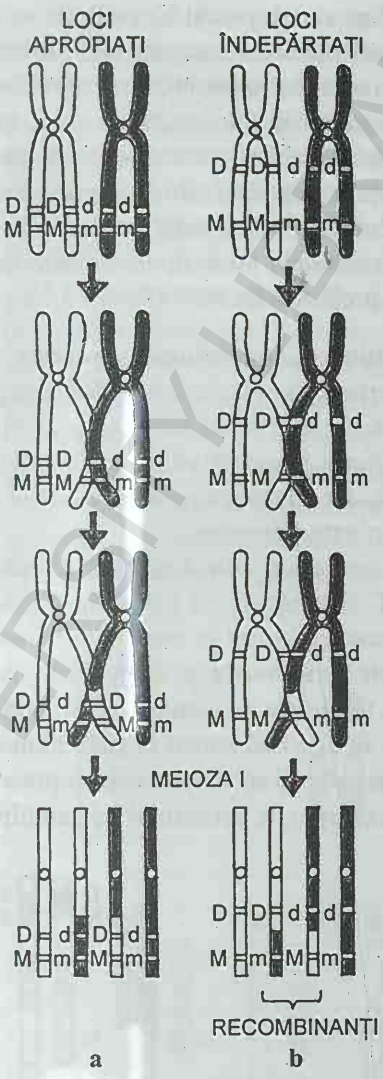


Figura 3.4. Încrucișarea cromozomială (*crossing-over*) între cromozomii omologi în timpul meiozei

a) Doi loci situați foarte aproape unul de altul, care se transmit în bloc; b) doi loci relativ îndepărtați, între care se produce CO și rezultă *gameți recombinanți*

2.2. *Încrucișarea cromozomială (*crossing-over*) și recombinarea genică omoloagă*

a) Mecanismul încrucișării cromozomiale

În profaza meiozei primare se produce o *împerechere (sinapsă) riguroasă „genă la genă", a cromozomilor omologi* urmată de o *„încrucișare"* a cromatidelor acestor cromozomi numită și **crossing-over** (CO). La locul de contact (*chiasmă*), cromozomii se pot „rupe" și efectua un *schimb egal de gene* (figura 3.4.b); astfel, o genă poate trece de pe un cromozom pe omologul său producându-se o nouă dispoziție/așezare a aleleor parentale. Acest fenomen a fost numit

9. Un locus (genă sau secvență de ADN) *marker* are rolul de a „semnaliza" prezența unui locus morbid cu care este strâns înlănțuit, fie atunci când acesta nu se exprimă fenotipic, fie în cazul în care este mai greu de identifict direct.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

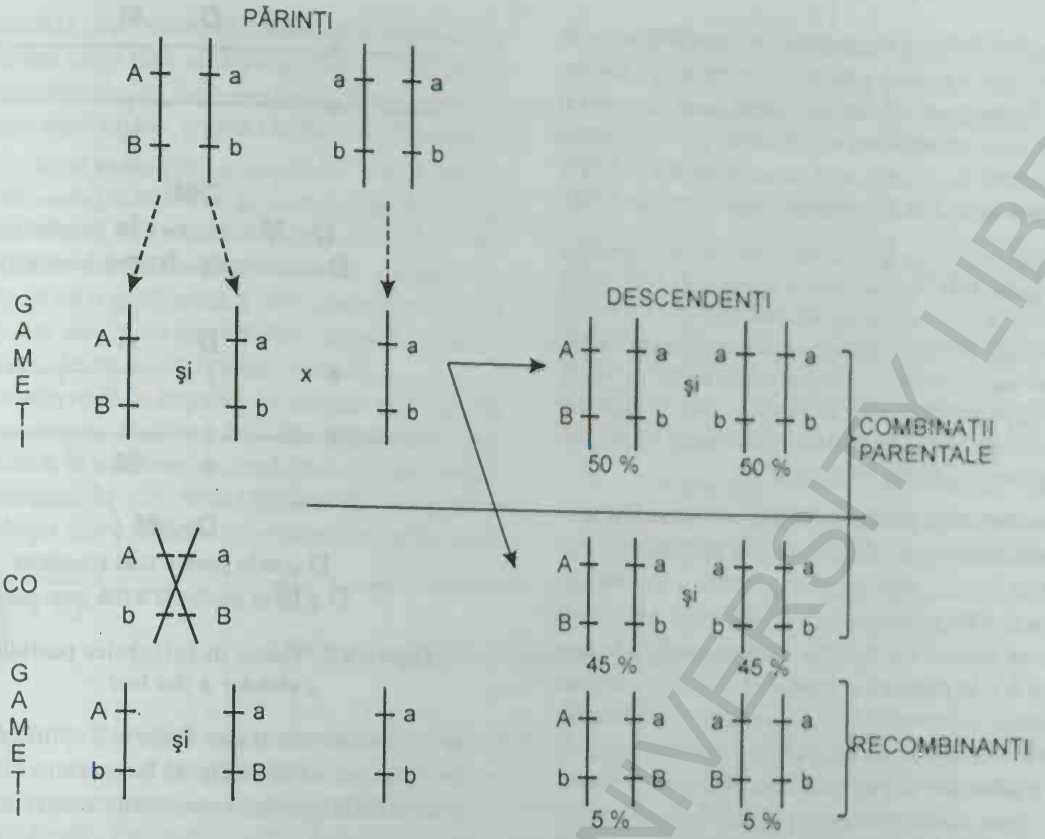


Figura 3.5. Evidenţierea fenomenului de încrucişare cromozomială (CO) prin încrucişarea unui dublu heterozigot (AB/ab) cu un homozigot recesiv (ab/ab)

recombinare genică omoloagă. În cazul recombinării a două gene nealele situate la distanţă pe acelaşi cromozom (figurile 3.3.b şi 3.4.b), după schimbul reciproc de gene se produc, prin meioză, patru tipuri diferite de gameţi, dintre care două au genotipuri noi, *recombinante*. Recombinarea genelor are loc numai dacă cromatida suferă un număr nepereche de CO între cei doi loci.

b) Punerea în evidenţă a CO

Evidenţierea fenomenului de *crossing-over* între două gene se poate face prin „încrucişarea" unui *dublu heterozigot pentru acele gene şi recesivul homozigot* (figura 3.5). Teoretic, ar trebui să rezulte proporţii egale de descendenţi cu aceleaşi genotipuri şi fenotipuri ca şi părinţii. În realitate, alături de combinaţiile parentale, apar şi combinaţii noi (*recombinanţi*), datorită CO produs la dublul heterozigot.

La om, fenomenul de CO şi recombinare intracromozomială a fost evidenţiat iniţial prin studiul transmiterii unor caractere determinate de mutaţii recesive ale unor gene de pe cromozomul X. În figura 3.6, din căsătoria unui bărbat (I-1) care prezintă **hemofilie** (h) cu o femeie sănătoasă rezultă patru copii sănătoşi şi un băiat (II-6) cu **protanopie** (p) (absenţa vederii colorate pentru roşu, sau daltonism). Acesta este hemizigot şi unicul său cromozom X cu alela mutantă (exprimată fenotipic) provine cert de la mamă, care va fi astfel heterozigotă (Pp). O soră sănătoasă (II-3) a bolnavului II-6 se căsătoreşte cu un bărbat sănătos şi are trei băieţi afectaţi: cu hemofilie (III-1), protanopie (III-3), hemofilie şi protanopie (III-4), precum şi unul sănătos (III-2). Se poate conchide, fără dificultate, că mama (II-3) celor patru băieţi este dublu heterozigotă (hP/hp) şi datorită acestui lucru este uşor de înţeles naşterea celor doi băieţi afectaţi de hemofilie (III-1) sau protanopie (III-3). În cazul celorlalţi doi copii (III-2 şi III-4) s-a produs un CO în meioza maternă.

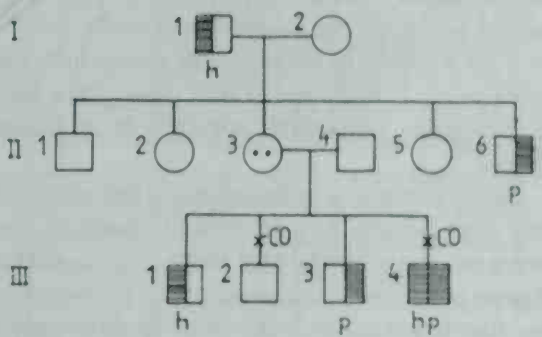


Figura 3.6. Evidenţierea fenomenului de *crossing-over* (CO) într-o familie cu hemofilie (h) şi protanopie (p), boli recesive produse de mutaţiile unor gene situate pe cromozomul X

c) Caracteristicile CO

Recombinările genice intracromozomiale, produse în meioză prin *crossing-over*, sunt fenomene *aleatorii şi imprevizibile*. Ele ascultă de o singură lege – *probabilitatea*; ca atare, *frecvenţa de producere a CO între două gene (loci) este direct proporţională cu*

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

distanța fizică dintre ele: șansele de recombinare sunt mai mici dacă genele sunt mai apropiate și invers. Gradul de apropiere (distanța)[10] între două gene (loci) de pe același cromozom se exprimă prin procentul recombinării: locii care sunt separați prin CO la 1% din gameți se află la distanță de 1 centiMorgan (cM).

Prin convenție s-a adoptat ca măsură a distanței genetice **morganul (M)**. Această unitate corespunde intervalului statistic în care, în cursul fiecărei meioze, are loc un eveniment de CO. Lungimea totală a genomului haploid uman este de 30M (30 fiind numărul mediu de evenimente recombinaționale la bărbat). Locii neînlănțuiți (fracție de recombinare 0,5) sunt considerați a fi despărțiți printr-o distanță de 50 centi M.

Recombinările genice între doi loci situați pe același cromozom se pot observa numai prin *studii familiale*. Explicația este simplă: pentru a evidenția/demonstra o înlănțuire sau o recombinare între două gene de pe același cromozom, trebuie analizată comportarea lor în meioză și *modul în care se transmit* prin gameți la urmași, deci la membrii unei familii. Comparând structura genică a cromozomilor urmașilor cu cea a părinților se poate aprecia *frecvența recombinărilor* între două gene (loci), distanța dintre ele și poziția lor în cromozomi. Aceste informații pot fi obținute numai când ambii loci ai celor doi cromozomi omologi parentali au alele diferite, iar numărul de meioze (în care s-a produs recombinarea) este suficient de mare, adică *familiile sunt mari și pot fi analizate pe cel puțin trei generații*. Dimensiunile și structura familiilor influențează decisiv semnificația statistică a rezultatelor; cel mai adesea, ca urmare a dimensiunilor, de regulă, mici ale familiilor umane, asigurarea statistică a datelor reclamă cumularea informațiilor provenite din studiul a mai multe familii. Recent s-a stabilit că fenomenul de recombinare genetică poate fi evidențiat și prin genotiparea unor spermatozoizi individuali proveniți de la același individ.

Datorită fenomenului de încrucișare cromozomială între două perechi de gene alele (de exemplu, *D/d* pentru un locus-morbid și *M/m* pentru un locus-marker al genei patologice), situate pe același cromozom în loci diferiți, pot exista două posibilități de dispunere denumite **faze de înlănțuire** (figura 3.7):

- alela unui locus, de exemplu, *D*, se poate afla pe același cromozom cu o alelă anumită a celuilalt locus, de exemplu, *M*, situație numită *fază de „cuplare" sau* **cis**;
- cele două alele *D* și *M* ale locilor respectivi se pot găsi fiecare pe cei doi cromozomi omologi, în *fază de „repulsie"* sau **trans**. Faza înlănțuirii depinde de alela care s-a întâmplat să fie prezentă la locusul markerului în momentul producerii mutației morbide.

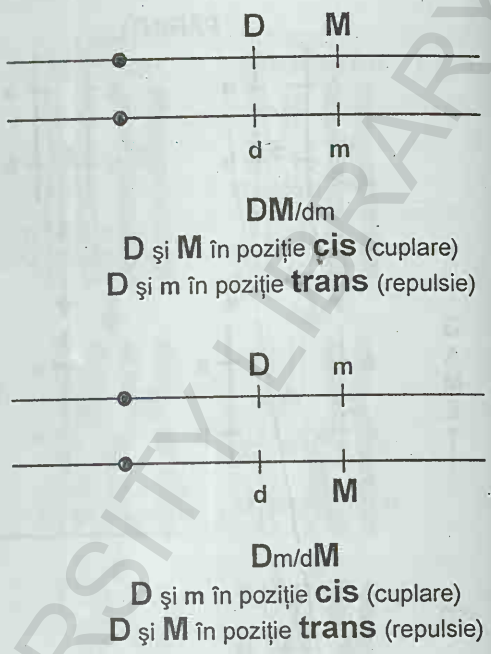


Figura 3.7. Fazele de înlănțuire posibile a alelelor a doi loci

În exemplul dat, genele *D* și *M* pot fi în poziție cis, iar *D* și *m* în poziție trans (genotipul se notează *DM/dm*) sau, invers, *D* și *M* în poziție trans, iar *D* și *m* în cis (genotip *Dm/dM*). În analizele de înlănțuire, pe care se bazează deseori diagnosticul genotipic al bolilor, este important *a se stabili faza de înlănțuire* între un locus-morbid *D* și alelele *M* sau *m* ale unui locus-marker *M* sau, mai precis, dacă alela *D* a locusului-morbid se găsește pe același cromozom fie cu alela *M*, fie cu alela *m* a locusului-marker. Aceasta se poate realiza numai prin studii familiale, urmărind cosegregarea (transmiterea împreună) a două gene nealele în generații succesive, fără schimbarea fazei.

2.3. *Dezechilibrul de înlănțuire și asocierile genetice*

a) Definiție

Diferitele gene alele ale unor loci diferiți, situate pe același cromozom în faza de cuplare (cis), pot forma combinații sau haplotipuri variate. De exemplu, în figura 3.7, genele alele *D* și *d* ale unui locus-morbid și *M* și *m* ale unui locus-marker pot realiza haplotipurile: *DM, dm, Dm* și *dM*. Deci locusul-morbid *D* poate fi asociat, în familii diferite, fie cu alela-marker *M*, fie cu alela-marker *m*. *Frecvența teoretică* cu care se găsesc anumite haplotipuri (*DM* sau *Dm*) într-o populație

10. Această distanță poate fi exprimată în două moduri: fie prin distanța genetică, fie prin distanța fizică (numărul de perechi de baze nucleotidice dintre cei doi loci). Distanța fizică este o cifră absolută greu de determinat. Distanța genetică este relativă, dependentă de distribuția de CO cu recombinări de-a lungul fiecărui cromozom.

BCU CLUJ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

se calculează prin produsul frecvenţelor individuale ale genelor alele ce-l alcătuiesc. Dacă se compară frecvenţa teoretică cu *frecvenţa reală* (determinată în populaţia respectivă), se pot constata două situaţii:

- frecvenţele reale ale haplotipurilor *DM* şi *Dm* nu diferă semnificativ faţă de frecvenţa teoretică; se spune atunci că genele ce alcătuiesc un haplotip se află în **echilibru de înlănţuire**. Aceasta înseamnă că o genă alelă a unui anumit locus (*D*) se poate asocia cu orice alelă a unui alt locus (*M sau m*), de pe acelaşi cromozom.
- frecvenţa reală în populaţie a unui anumit haplotip (de exemplu, *Dm*) este mai mare decât frecvenţa teoretică; în acest caz, se produce o *asociere alelică preferenţială* sau **dezechilibru de înlănţuire** (*linkage disequilibrium*): o anumită alelă a unui anumit locus (*D*) se asociază pe acelaşi cromozom cu o anumită alelă (*m*) a altui locus, *mai frecvent* decât ar fi de aşteptat pe bază de întâmplare.

b) Mecanism

Dezechilibrul de înlănţuire este *o caracteristică populaţională*, şi nu familială, ce depinde de *distanţa genetică* dintre loci şi de *vechimea mutaţiei* (*„distanţa" cronologică*). Explicaţia acestui fenomen este, în esenţă, înlănţuirea strânsă dintre alela morbidă *D* şi alela marker *m*, care face dificilă realizarea unui CO între ele; această înlănţuire poate fi explicată şi prin faptul că bolnavii au un *strămoş comun*.

Un exemplu sugestiv este reprezentat de **hemocromatoza ereditară clasică (tipul 1),** una dintre cele mai frecvente boli recesive la om (vezi caseta 3.1), în

CASETA 3.1 *OMIM # 234200; 602390*

Hemocromatoza ereditară clasică (tip 1)*

***Definiţie**: hemocromatoza ereditară clasică (HE) este o boală autozomal recesivă a metabolismului fierului, caracterizată prin absorbţia crescută a fierului prin mucoasa gastrointestinală ce determină acumularea excesivă a acestui element în diferite organe ale adulţilor.*

***Incidenţă**: Frecvenţa homozigoţilor în populaţia nord-europeană este 1/200-1/400, iar cea a heterozigoţilor este 1/9. Prevalenţa este mult mai scăzută la asiatici şi africani.*

***Manifestări clinice**: boala debutează la circa 40 de ani la bărbaţi şi 60 de ani la femei (deoarece acumulările de fier sunt mai reduse datorită pierderilor menstruale) cu oboseală, dureri abdominale şi articulare, letargie, pierdere ponderală, scăderea libidoului. Depozitarea excesivă a fierului în ficat, inimă, pancreas, piele şi sistem endocrin determină o serie de simptome incluzând ciroză, insuficienţă cardiacă congestivă sau aritmii, pigmentare cutanată, diabet zaharat, artrită şi hipogonadism.*

***Patogenie**: dereglare a cascadei de sinteză a hepcidinei care reglează homeostazia fierului prin fixare la feroportină, o proteină transmembranară cu funcţie de exportator extracelular de fier; complexul proteic HFE/TrR1 este un reglator al sintezei de hepcidină.*

***Genetică**: transmitere autozomal recesivă. Gena pentru hemocromatoza ereditară (gena HFE) este localizată lângă locusul HLA, pe cromozomul 6p21.3, distal de gena A. La peste 80% dintre bolnavii originari din ţările nord-europene s-a identificat o mutaţie unică C282Y (care produce substituţia cisteinei cu tirozină, în poziţia 282 a proteinei). Evidenţierea acestei mutaţii poate fi folosită ca test direct pentru diagnosticul bolii sau examinarea altor membri cu risc din familie. Această mutaţie se asociază cu alela HLA A3 („dezechilibru de înlănţuire"), sugerând descendenţa purtătorilor mutaţiei dintr-un strămoş comun. Hetrozigoţii (11% din populaţie) au avut un avantaj selectiv deoarece o mare parte din populaţie suferea de anemie feriprivă.*

***Diagnostic**: se bazează pe datele clinice, biochimice, histologice şi moleculare. Pacienţii nu au întotdeauna tablou complet. Diagnosticul se bazează pe saturaţia cu fier a transferinei serice şi concentraţia serică crescută de feritină; este confirmat prin măsurarea depozitelor hepatice de fier prin biopsia hepatică şi/ sau testarea moleculară a mutaţiilor în gena HFE.*

***Diagnostic diferenţial**: trebuie avute în vedere alte încărcări excesive cu fier: anemia sideroblastică, porfiria cutanea tarda, atransferinemia congenitală, hemocromatoza neonatală şi hemocromatoza juvenilă.*

***Diagnostic prenatal**: teoretic posibil dacă se cunoaşte tipul mutaţiei la părinţi (heterozigoţi). Ridică probleme etice, fiind o boală tratabilă şi cu debut tardiv.*

***Prognostic**: bun sub tratament.*

***Tratament**: tratament simplu, ieftin, sigur şi eficient ce constă în flebotomie periodică (îndepărtarea unei unităţi de sânge ce conţine 160-200 mg fier).*

* Există şi alte forme de hemocromatoză, nonclasice (tip 2a şi b, 3 şi 4), rare, produse prin mutaţii ce afectează alte molecule implicate în metabolismul fierului.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

care la bolnavii adulți se produce o acumulare excesivă de fier; depozitele de fier din ficat, cord, pancreas, piele și sistemul endocrin produc o varietate de manifestări clinice inclusiv ciroză hepatică, insuficiență cardiacă, deficiență de hormoni hipofizari, diabet „bronzat" (insuficiență pancreatică endocrină și pigmentarea pielii). Mai multe studii multicentrice au arătat că majoritatea pacienților cu hemocromatoză au și alela *A3* a locusului *HLA*, în timp ce frecvența ei la persoanele sănătoase este de numai 27%. Pe baza acestei înlănțuiri genetice s-a localizat gena hemocromatozei (*HFE*) în regiunea 6p21.1, distal de gena *HLA A* (figura 3.3.c); ulterior s-a identificat gena *HFE*, în care o singură mutație (ce interesează codonul 282, numită C282Y) se găsește la 85% din bolnavi. Această mutație s-a produs, foarte probabil, acum ~ 4.000 de ani, la o singură persoană ce avea pe cromozomul 6 alela *HLA A3*. Răspândirea mutației se explică prin avantajul selectiv al heterozigoților, într-o populație ce suferea de anemie feriprivă.

Dezechilibrul de înlănțuire reflectă un anumit *fond comun de gene* (genofond) al populației respective. Interpretarea obișnuită a dezechilibrului de înlănțuire este că cei mai mulți indivizi ce poartă gena mutantă (morbidă) provin dintr-un *strămoș comun* („fondator") care a avut haplotipul cel mai des asociat cu alela mutantă (vezi și capitolul 8).

Dezechilibrul de înlănțuire ce include un locus-morbid bialelic (*D* și *d*) și un marker permite stabilirea *vechimii mutației* ce produce boala („datarea" ei), precum și a faptului că mutația a survenit la un singur individ („**efect de fondator**") sau independent, la mai mulți indivizi, în arii geografice diferite („origine multicentrică"). Această „paleo-antropo-genetică" poate fi demonstrată prin două exemple:

- *drepanocitoza* sau sicklemia are o vechime de 3.000 de ani și origine multicentrică (trei focare distincte în Africa și unul în Asia);
- *deficitul în alfa-1-antitripsină* datează de aproximativ 6.000 de ani și are un singur „fondator", în Europa de Nord; același lucru pare a fi valabil și pentru *fibroza chistică* (*mucoviscidoză*).

c) Asocierile genetice

Fenomenul de înlănțuire (care se referă la locii dintr-un cromozom) nu trebuie confundat cu **asocierea** care este *o relație statistică* (pusă în evidență în populație) între un caracter (boală) și un marker genetic.

- De exemplu, **spondilita anchilozantă** – o boală inflamatorie cronică ce afectează ligamentele, discurile intervertebrale și articulația sacro-iliacă – se asociază la 90% dintre bolnavi cu alela HLA B27. În populația generală, frecvența bolii este de circa 1%, iar frecvența alelei *B27* de 5-10%; deci multe persoane *HLA B27* nu fac boala, dar au un risc de 90 ori mai mare de a o dezvolta, comparativ cu cei care nu au această alelă. Este important să precizăm că factorii genetici și de mediu care produc această afecțiune nu au fost identificați și că asocierea populațională observată nu implică în mod necesar o înlănțuire genetică. Deoarece spondilita anchilozantă este considerată o boală autoimună, asocierea poate reflecta totuși faptul că sistemul HLA este un factor important în patogenia bolii.
- O altă asociere populațională a fost observată între **diabetul zaharat insulino-dependent** (tipul 1) și alelele *HLA DR3* și *HLA DR4*. Deoarece în diabetul tip 1 autoimunitatea este un factor etiologic, se poate presupune că alelele *DR3/DR4* cresc susceptibilitatea la această boală (capitolul 14).

Se poate conchide că asocierile populaționale reflectă participarea semnificativă a unor factori genetici sau negenetici în etiologia unor boli. Ele trebuie deosebite de înlănțuirile genetice, care se referă la poziția unor loci în cromozomi. Dezechilibrul de înlănțuire este un caz special de asociere în care există o asociere neîntâmplătoare a unei alele specifice (morbidă) cu un locus din vecinătate (marker).

d) Valoare practică

Asocierea alelică preferențială s-a folosit în diagnosticul genotipic prenatal sau diagnosticul presimptomatic al unei boli în familiile cu risc crescut. Acest lucru este posibil atunci când se realizează asocierea preferențială a genei pentru o boală cu o alelă specifică a unui locus-marker, strâns înlănțuit cu locusul-morbid.

De exemplu, pe cromozomul 7, în apropierea genei *CF* pentru fibroză chistică sau mucoviscidoză (boală genetică frecventă în populația europeană, 1:3.500 nn), se găsesc doi markeri genetici, XV-2c și KM-19, fiecare cu două alele (figura 3.8). S-a stabilit că marea majoritate (90%) a indivizilor ce poartă alela mutantă ΔF508

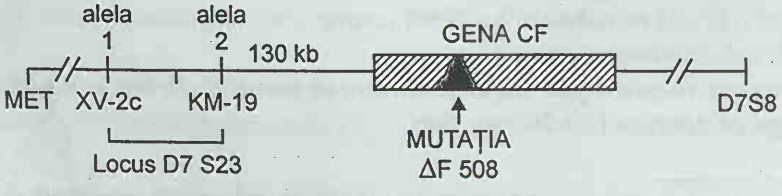


Figura 3.8. Asocierea preferențială (dezechilibrul de înlănțuire) a genei CF (pentru fibroza chistică) și markerii genetici situați în apropierea ei

a genei *CF* mutantă posedă de asemenea alelele 1 (XV-2c) şi 2 (KM-19) ale celor doi markeri; acest haplotip (alela 1 – alela 2 – *CF*) se găseşte în populaţie doar în 20% din cromozomii ce poartă alela *CF* normală (restul cromozomilor „normali" având alte haplotipuri).

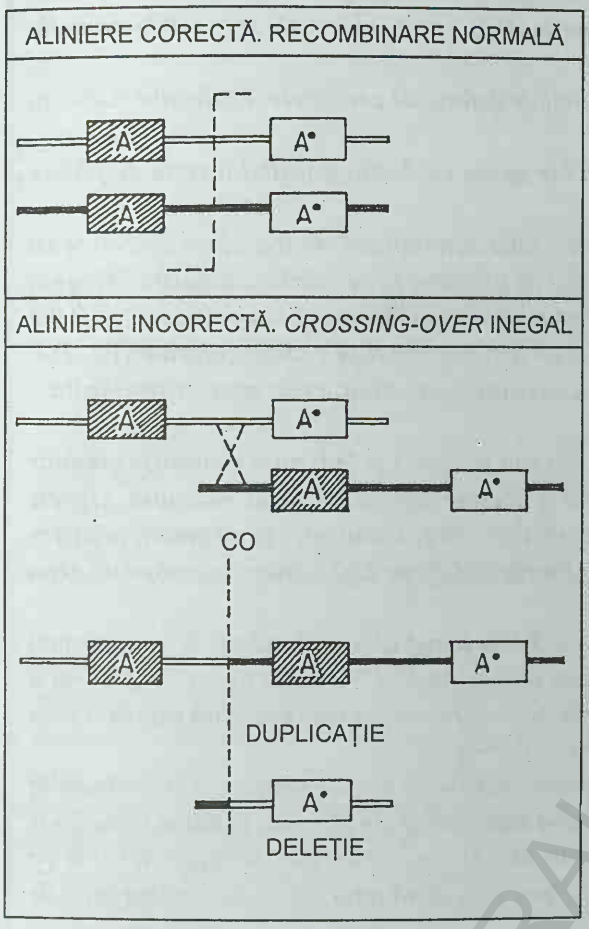


Figura 3.9. *Crossing-over* inegal

Existenţa pe acelaşi cromozom a unor secvenţe (A şi A*) asemănătoare sau identice favorizează alinierea şi împerecherea incorectă a cromozomilor omologi în meioză; prin *crossing-over* se produce în acest caz duplicaţia şi deleţia unei gene sau părţi din cromozom

2.4. *Importanţa teoretică şi practică a fenomenelor de înlănţuire şi recombinare genică*

a) Importanţa teoretică

- *Cartografierea genomului uman.* Înlănţuirea şi recombinarea genică sunt utilizate, alături de alte metode, pentru localizarea genelor în cromozomi. Fără a intra în detalii (vezi capitolul 5.E), vom preciza următoarele elemente utile în cartografierea genică: (1) două gene care se transmit strâns înlănţuite la descendenţi sunt localizate pe acelaşi cromozom; (2) frecvenţa de producere a *crossing-over*-ului între două gene este direct proporţională cu distanţa dintre ele; (3) prin studii familiale, calculând frecvenţa de recombinare a genelor la descendenţi, se poate stabili poziţia lor pe cromozomi.
- *Înţelegerea mecanismelor de producere a unor mutaţii.* Uneori se poate produce în meioză o încrucişare cromozomială aberantă sau ***crossing-over inegal*** care poate genera mutaţii genice sau anomalii de structură ale cromozomilor. El este rezultatul unei *împerechere imperfectă* (ilegitime) a unor secvenţe asemănătoare de pe cromozomii omologi; schimbul de segmente prin *CO nu se face egal* şi pot rezulta *deleţii şi duplicaţii* genice sau cromozomiale (figura 3.9); acestea au deseori consecinţe fenotipice negative. Cel mai sugestiv exemplu pentru acest mecanism îl reprezintă tulburările perceperii culorilor (protanopia şi protanomalia – pentru *roşu* şi deuteranopia şi deuteranomalia – pentru *verde*) (vezi caseta 3.2).
- *CO inegal* a avut însă – foarte probabil – şi un rol pozitiv în evoluţie, generând *duplicaţia sau hiperduplicaţia unor gene ancestrale*. Au rezultat mai multe „exemplare" ale genei iniţiale care, ulterior, au evoluat diferit; ele păstrează însă o serie de caracteristici comune formând *familii sau superfamilii de gene înrudite* (vezi capitolul 3.B.3.2). Un exemplu sugestiv îl reprezintă genele ce determină diferite catene polipeptidice (alfa, beta, gama, delta) din structura hemoglobinelor umane. Ele au rezultat prin duplicaţia succesivă a unei gene ancestrale (figura 3.10).

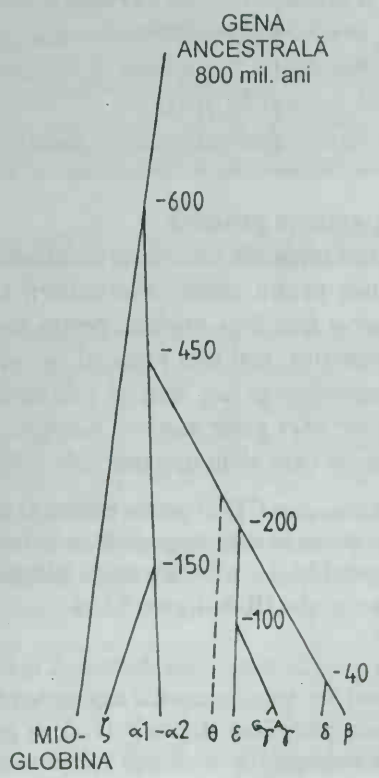


Figura 3.10. Evoluţia filogenetică a genei mioglobinei şi genelor globinelor, prin duplicaţii succesive, dintr-o genă ancestrală

ROMANIAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 3.2 *OMIM # 303800/303900*

Defectele perceperii culorilor

Definiții: *incapacitatea ereditară a perceperii culorii roşu se numeşte* ***protanopie (P),*** *a culorii verde –* ***deuteranopie (D)*** *iar a culorii albastre –* ***tritanopie*** (T); *perceperea alterată (parțială) a culorii roşu este numită* ***protanomalie (PA),*** *a culorii verde -* ***deuteranomalie (DA),*** *iar a culorii albastre –* ***tritanomalie (TA).***

Incidență: *8% din bărbații caucazieni au un tip sau altul de defecte de percepere a culorilor roşu sau verde; frecvența lor la femei este mult mai mică, 0,4%.*

Diagnostic: *defectele vederii colorate şi intensitatea lor se pot evidenția folosind o serie de planşe colorate sau anomaloscopia.*

Patogenie: *vederea colorată normală este tricromatică fiind determinată de trei clase de celule cu conuri care au un pigment (opsina) ce reacționează la culorile primare: roşu, verde şi albastru. Absența sau alterarea pigmentului vizual, produsă prin mutația genelor corespunzătoare, va determina diferite defecte ale vederii colorate: tricromatopsia – când există un deficit parțial al vederii colorate (PA, DA, TA); dicromatopsia – când nu se percepe una din culorile primare – sau, foarte rar, monocromatopsia – nu se percep niciuna din aceste culori.*

Genetică: *Defectele de vedere a culorilor roşu (P şi PA) sau verde (D şi DA) sunt transmise ereditar recesiv legat de X; acest fapt explică frecvența crescută a acestor defecte la sexul masculin. Genele pentru opsinele sensibile la culorile fundamentale au fost identificate şi localizate: gena pentru albastru (BCP) - pe cromozomul 7, iar genele pentru roşu (RCP) şi verde (GCP) pe Xq28, foarte aproape de gena pentru factorul VIII.*

Genele pentru roşu şi verde sunt situate pe cromozomul X una lângă alta, în tandem; în mod normal există o genă pentru roşu şi 1-3 copii identice pentru gena pentru verde. Cele două tipuri de gene au o secvență aproape identică (96% omologie). Pentru vederea colorată normală este necesară expresia unei singure gene pentru pigmentul roşu şi a unei gene pentru cel verde.

Dispunerea în tandem şi secvența lor foarte asemănătoare generează frecvent împerecheri eronate în meioză şi producerea unui CO inegal, între gene, modificând numărul lor (în plus sau în minus) sau chiar în gene, producând modificări în structura lor sau gene hibride. Absența genei pentru roşu sau verde va genera protanopie şi respectiv deuteranopie, iar hibrizii dintre cele două tipuri de gene – tulburările de percepție de tipul PA şi DA.

Prognostic: *Indivizii afectați au dificultăți de a vedea, dar se pot „adapta" uşor la aceste situații.*

b) Importanța practică

În practica medicală, fenomenul de înlănțuire genică a fost folosit pentru *studiul transmiterii unei gene mutante într-o familie* şi, implicit, pentru diagnosticul de boală genetică, mai ales prenatal sau presimptomatic. Diagnosticul se face *indirect*, prin analiza *distribuției alelor unei gene marker, normală*, uşor de identificat, cu care alela mutantă este înlănțuită.

De exemplu, gena CYP21 pentru enzima 21 hidroxilază (care intervine în steroidogeneză), este localizată pe cromozomul 6p şi se transmite strâns înlănțuită cu gena B a complexului HLA (figura 3.3.c).

Mutația genei 21-hidroxilază determină, în stare homozigotă (*aa*), un deficit enzimatic care perturbă steroidogeneza suprarenaliană (figura 3.11.a); se produce un exces de androgeni ce determină la embrionul feminin un *grad de masculinizare* a organelor genitale externe sau **sindromul adreno-genital** (boală autozomal recesivă). Transmiterea genei mutante pentru 21-hidroxilază într-o familie şi diagnosticul bolii se pot stabili prin identificarea alelelor genei marker *HLA-B*, cu care alela mutantă este strâns înlănțuită.

În familia A... (figura 3.11.b) s-a născut un copil (II-3) cu sindrom adreno-genital; la o nouă sarcină (II-4) părinții solicită un sfat genetic pentru evaluarea riscului de recurență a bolii şi, eventual, un diagnostic prenatal. Soluție: copilul bolnav (*aa*) moşteneşte câte o alela mutantă (*a*) de la fiecare dintre părinți (sănătoşi, dar heterozigoți, *Na*); aceste gene sunt înlănțuite cu alela *HLA B14* la tată şi *HLA B5* la mamă. Determinarea grupelor HLA la copii relevă că: primul copil sănătos *B1/B5* este heterozigot (*Na*); la al doilea *B14/B5* se decelează, surprinzător (poate şi pentru că era băiat), o formă asimptomatică a bolii; în schimb, fătul (II-4) are genotipul HLA *B1/B7* şi deci va fi sănătos (NN).

Valoarea diagnostică a înlănțuirilor genice dintre un locus-morbid şi unul marker a fost larg utilizată după 1980, prin folosirea markerilor ADN polimorfici; progresele recente în analiza directă a genelor au înlocuit aceste tehnici.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

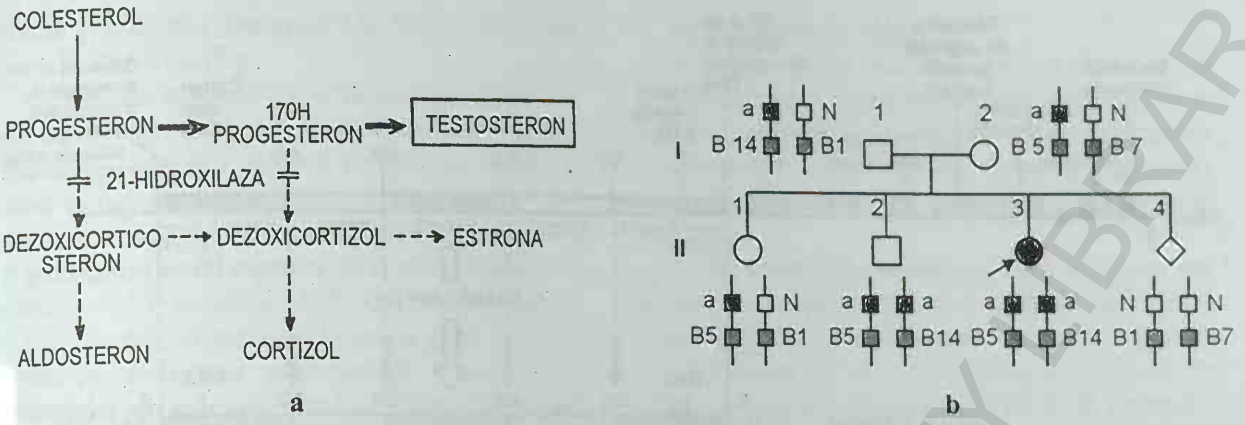


Figura 3.11. Diagnosticul indirect al deficienţei în 21-hidroxilază (sindromul adreno-genital) cu ajutorul genei HLA-B, strâns înlănţuită cu gena CYP21 ce codifică enzima 21-OH

a). Schema simplificată a steroidogenezei corticosuprarenaliene; deficitul în 21-OH produce un exces de androgeni (ce produc masculinizarea unui fetus XX) şi absenţa (totală sau parţială) de aldosteron şi cortizol (ce determină „pierderea de sare"); în absenţa cortizolului (stimulul feedback de reglare a sintezei de ACTH) se produce continuu ACTH care stimulează glanda şi determină hipertrofia congenitală de suprarenală.
b). Distribuţia alelelor genei marker HLA B şi a genei mutante 21-OH într-o familie.

B. Concepţia actuală despre structura genei

Concepţia actuală despre structura şi funcţia genei se bazează în esenţă pe rolul genetic al ADN-lui. Gena a fost definită ca un *ansamblu liniar de secvenţe nucleotidice, necesar pentru a produce un polipeptid sau o moleculă de ARN funcţional*; acest complex include secvenţe transcrise (codante şi necodante), precum şi secvenţe de reglare a transcripţiei. În cea mai succintă definiţie, *gena este o unitate de transcripţie* ce determină un anumit fenotip sau funcţie.

Transcripţia genelor este realizată de trei tipuri de ARN polimeraze: I, II şi III. *Genele ce codifică proteine* sunt totdeauna transcrise de ARN polimeraza II care produce ARN mesager codant. *Genele ARN* (ce codifică ARN necodant) sunt transcrise de ARN polimerazele I, II sau III , în funcţie de tipul de ARN sintetizat.

Majoritatea genelor umane au o *structură discontinuă* (alcătuită din secvenţe codante şi secvenţe necodante) pentru descoperirea căreia Richard Roberts şi Philip Sharp au primit premiul Nobel (în 1993).

1. Anatomia unei gene care codifică o proteină

Genele care codifică proteine prezintă *o regiune centrală*, transcrisă (copiată) în ARN mesager precursor, numită şi „*cadru deschis de lectură*"[11] a informaţiei genetice deoarece conţine mesajul codificat pentru sinteza proteinei, flancată la cele două capete (proximal 5' şi distal 3') de secvenţe netranscrise al căror rol este cel de regalare a expresiei genei (figura 3.12.). În descrierea acestor regiuni ne vom referi la catena 5'-3' a ADN sau *catena sens*. Vom preciza că nu există o structură definită absolută a genelor; vom prezenta un „model general", cel mai frecvent întâlnit, care la gene diferite prezintă variaţii structurale şi funcţionale.

1.1. Regiunea centrală (cadru deschis de lectură) a genei

Regiunea centrală a genei este *transcrisă integral* în ARN mesager precursor, prin acţiunea ARN-polimerazei II. Această regiune este alcătuită din alternanţa regulată a două tipuri distincte de secvenţe: *exoni şi introni*, prezente sau nu în versiunea finală a *ARNm matur*, ce va părăsi nucleul.

Regiunea centrală a genei începe cu **situsul de start al transcripţiei** (SST), care este numit prescurtat şi **Inr** (de la *initiator sequence)*. După SST urmează o *regiune necodantă* (transcrisă, dar netranslată) de câteva sute de nucleotide şi numită **regiunea 5'UTR** (de la *untranslated region*) sau „*secvenţa lider*", care începe la poziţia +1 (unde începe

11. Termenul se referă la citirea şi copierea informaţiei genetice a genei, pe baza căreia se sintetizează un polipeptid. „Cadrul deschis de lectură" – prescurtat şi *ORF* (de la *Open Reading Frame*) – începe cu codonul iniţiator şi se termină la nivelul unui codon stop.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

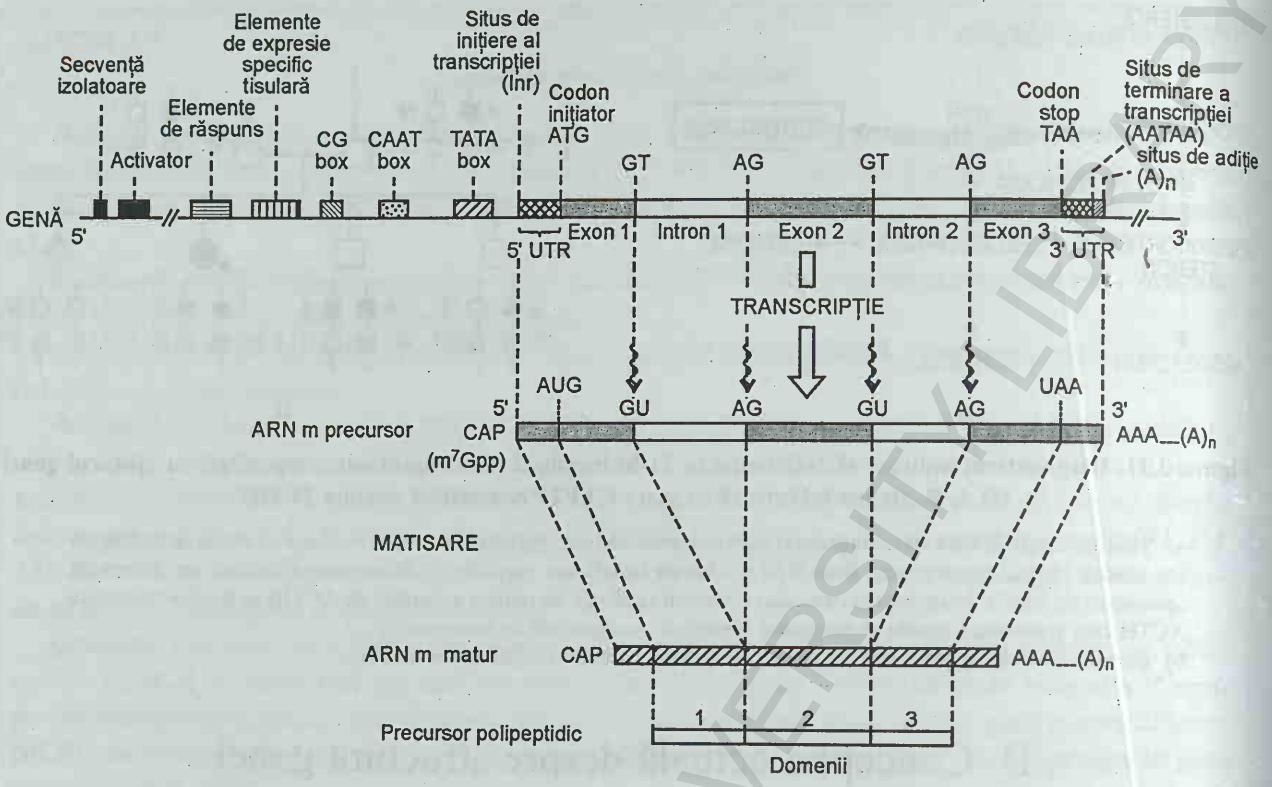


Figura 3.12. Structura şi expresia unei gene prototip ce codifică proteine

(modificat după Strachan şi Read, 1999; Gelherter *et al.*, 1998)

Elementele structurale ale genei sunt descrise în text. Procesul de transcripție, formarea ARN mesager precursor şi din acesta (prin decuparea intronilor) a ARN mesager matur va fi descris în capitolul 4

transcripția) şi se termină la codonul inițiator. Ea conține o secvență *consensus* (prezentă la toate genele) 5'-CCAGCC**ATG**-3', care include şi *codonul inițiator ATG* şi are un rol important în reglarea translației. În regiunea 5'UTR se pot găsi şi alte elemente reglatoare (de exemplu, „*riboswitch*"[12]). Urmează exonul 1.

Exonii *sunt secvențe transcrise în ARN mesager precursor şi păstrate în ARNm matur* (figura 3.12.) (denumirea lor se bazează pe faptul că sunt secvențe ce se exprimă şi părăsesc (*exit*) nucleul). Ei sunt regiunile funcționale din structura genei, care *codifică* anumite părți structurale şi/sau funcționale distincte ale proteinei. Numărul exonilor variază de la o genă la alta (între 2 şi mai mult de 50, cu o medie de 8).

Este util de precizat că nu este obligatoriu ca exonii să fie întotdeauna părți codante/translate ale genei; în unele gene unii exoni nu sunt translați deşi sunt prezenți în ARNm matur (de exemplu, exonul 1 în gena pentru insulină). Recent, s-a constatat un alt lucru surprinzător: gene diferite pot avea unul sau mai mulți exoni identici – în consecință, diferite proteine complexe, neînrudite, pot avea unele segmente identice. Spre exemplu, gena pentru receptorul LDL (lipoproteine cu densitate joasă) are exoni ce produc în structura receptorului segmente proteice regăsite în multe alte proteine. Explicația acestui fenomen nu este clară, dar unii autori susțin că în evoluție s-ar fi putut asambla gene noi din exonii unor gene preexistente.

Intronii – numiți şi „*Intervening Sequences*" sau *secvențe intercalate* pentru că se interpun între exoni) – sunt *secvențe necodante*, transcrise inițial în ARNm precursor (transcript primar) dar decupate precis şi îndepărtate ulterior din ARNm matur[13], ce va fi alcătuit prin asamblarea exonilor (figura 3.12.). Deoarece genele încep şi se termină cu exoni, numărul acestora îl depăşeşte cu o unitate pe cel al intronilor. Lungimea intronilor este variabilă, neconcordantă cu a exonilor, deobicei mult mai mare (între câteva sute şi câteva mii de pb). Important de precizat este faptul că majoritatea intronilor încep cu dinucleotidele **5' GT** şi sfârşesc cu **AG 3'**; o minoritate a intronilor sunt delimitați de secvențele dinucleotidice **AT** la capătul 5', respectiv **AC** la capătul 3'. Aceste perechi de nucleotide au rolul unor semnale (balize) pentru decuparea

12. Un „*riboswitsh*" este o secvență din ARNm şi ADN care funcționează ca un fel de „comutator": după ce fixează direct o moleculă mică (un metabolit) ARNm reglează activitatea genei care îl codifică.
13. Procesul de asamblare a exonilor, ce va fi descris în capitolul 4, se numeşte „*splicing*" – în limba engleză, „*epissage*" – în limba franceză; traducerea acestor termeni în limba română ar fi: înnădire, îmbinare cap la cap sau, tehnic vorbind, *matisare*).

FOR STUDENT USE ONLY

precisă şi corectă a intronilor (de către o moleculă specială de ARNsn[14]).

Originea şi rolul intronilor nu sunt încă bine cunoscute. Foarte probabil ei intervin în selecţia şi combinarea exonilor ce vor fi încorporaţi în ARNm matur şi fenomenul de **matisare alternativă**, care este o sursă majoră de sporire a diversităţii proteinelor (o genă poate astfel conduce la sinteza mai multor proteine, vezi în capitolul 4.D.2). Uneori, surprinzător şi inexplicabil, ei pot lipsi în unele gene (precum genele pentru histone, angiotensină, receptori beta adrenergici sau gene conţinute în ADN mitocondrial), iar alteori, unii introni (din genele pentru NF1, factor VIII ş.a.) pot conţine **gene incluse**, transcrise (în direcţie opusă), fără nici o legătură cu gena în care se găsesc. De asemenea, la nivelul intronilor se pot găsi secvenţe cu rol reglator în funcţia genei (vezi capitolul 4.D.2).

Originea şi evoluţia intronilor este neclară. O ipoteză larg acceptată presupune că intronii sunt „foarte vechi", au existat la *progenote*, strămoşii procariotelor şi eucariotelor; ei s-au pierdut la procariote, asigurând astfel o eficienţă maximă a transcripţiei, dar s-au păstrat la eucariote permiţând un repertoriu mai amplu de proteine codificate.

Ultimul exon al genei conţine unul din **codonii stop** (TAA, TAG, TGA) ce marchează sfârşitul cadrului deschis de lectură. În aval de codonul stop urmează o **regiune 3'UTR** necodantă (transcrisă, dar netranslată) de mărime variabilă ce conţine un hexanucleotid **AATAAA** numit *situs de poliadenilare.* Această secvenţă nucleotidiocă este recunoscută de un complex proteic ce determină clivarea moleculei de ARNm la nivelul unui dinucleotid **CA** situat 10-20 de base în aval şi adaugarea unei secvenţe poli(A) la acest nivel de către enzima poli(A)polimerază. Regiunea 3'-UTR poate conţine situsuri de fixare pentru diverse proteine sau ARNmi, molecule cu rol reglator a transcripţie

1.2. Regiunile de reglare a genei

Cadrul de lectură al oricărei gene sau regiunea transcrisă este flancat de două regiuni, *netranscrise*, care au rolul de *a semnaliza iniţierea sau terminarea transcripţiei* de către ARN-polimerază şi de *a regla intensitatea ei.* Majoritatea secvenţelor reglatoare se află în amonte de SST, spre capătul 5' al genei.

a) Regiunea de reglare 5'

Această regiune, situată în amonte de cadrul de lectură a genei, prezintă **promotorul** – locul unde se fixează *„maşinăria ce declanşează transcripţia"* atunci când gena se exprimă – şi **alte elemente reglatoare** *„adiţionale"*, care stabilesc locul şi/sau momentul expresiei.

(1) **Promotorul** conţine mai multe *elemente sau module (cis-activatoare*[15]*)* cu o secvenţă nucleotidică scurtă şi precis definită, situate aproape una de alta, în vecinătatea SST pe o distanţă de circa 200 pb. Pe aceste secvenţe se fixează nişte proteine reglatoare (*trans-activatoare*) numite **factori de transcripţie generali** (TF II[16]) care au rolul să *fixeze* şi *să poziţioneze* ARN-polimeraza II – astfel ca transcripţia să înceapă exact la SST, cu primul nucleotid (+1), precum şi de a *activa* enzima. Trebuie precizat că ARN-polimeraza nu poate recunoaşte direct promotorul şi nu poate iniţia singură transcripţia. Este nevoie de o interacţiune complexă între enzimă, elementele cis-activatoare ale promotorului genei şi proteinele trans-reglatoare (TF II) care se vor fixa la promotor (vezi capitolul 4.D.2). Promotorul eucariotelor superioare este alcătuit (figura 3.13) din *„miezul promotorului"* unde se fixează ARN polimeraza II şi aşa numitul *„promotor proximal"* cu rol de reglare.

Miezul promotorului conţine *elemente* care iniţiază transcripţia, formând împreună cu ARN-polimeraza şi factorii de transcripţie generali (în special TFIID şi B) *complexul transcripţional bazal.* Aceste elemente, relativ identice la majoritatea genelor care codifică proteine, sunt:

- **TATA box** are secvenţa consensus 5'-TATAAA-3' situată de obicei la circa 25 pb în amonte de SST) fiind locul în care se fixează ARN-polimeraza II la ADN (prin intermediul TFIID). Această secvenţă este importantă în demararea *precisă* a transcripţiei (în punctul de start), asigurând expresia genei la un *nivel bazal*; mutaţia secvenţei TATA nu împiedică iniţierea transcripţiei, dar produce o deplasare a punctului de start faţă de normal. TATA box este prezentă la majoritatea *genelor specifice de ţesut* (de exemplu, beta-globina) sau a genelor care se exprimă în anumite momente ale ciclului celular (de exemplu, histonele).
- **GC box** (conţine secvenţa 5'-GGGCGG-3') se găseşte de obicei în mai multe exemplare, a căror număr şi poziţie sunt variabile la diferite gene,

14. Există introni care au capacitate autocatalitică, funcţionând ca ribozime, care îşi realizează ei înşişi decuparea din ARN mesager precursor.
15. Elementele (secvenţele) *cis-activatoare* acţionează asupra altor secvenţe situate pe aceeaşi moleculă în timp ce elementele *trans-activatoare* acţionează „intermolecular", asupra unor secvenţe din molecule diferite.
16. Prefixul TF semnifică *transcription factor*, iar II arată tipul de ARN polimerază cu care se asociază; urmează o literă: A, B, C, D... care specifică un anumit TF. Factorii de transcripţie sunt elemente *trans-acting*, deoarece sunt sintetizaţi de gene situate la distanţă de situsurile de acţiune şi ei migrează la acest loc.

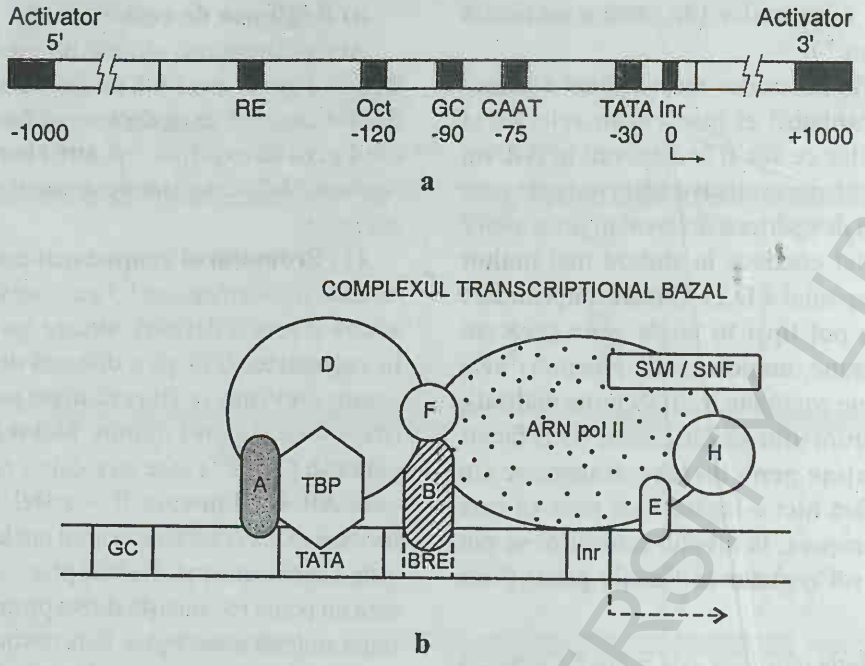


Figura 3.13. Regiunea laterală 5' și promotorul unei gene umane ce codifică proteine

(modificat după Hoffee, 1998)

a). Structura promotorului; b). Asamblarea factorilor de transcripție și ARN polimerazei la elementele promotorului

situate la circa 50-100 pb în amonte față de SST. GC box modulează transcripția bazală a *genelor comune* („*housekeeping genes*") – funcționale în toate țesuturile (de exemplu, genele pentru sinteza acizilor nucleici).

- **CAAT box** (conține secvența 5'-GGCCAAT-3') este situată în amonte de caseta TATA (la circa 80 pb de SST) și fixează alți TF care *modulează* transcripția bazală, inițiată de secvența TATA.

În *regiunea proximală a promotorului* se mai găsesc (la circa 100-200 pb în amonte de SST) o serie de secvențe ADN care, după fixarea anumitor factori de transcripție, determină *locul (țesutul) și momentul* în care are loc expresia unor gene. El conține:

- **elemente care determină expresia specific-tisulară a anumitor gene**; de exemplu, expresia specifică a anumitor gene în eritroblaști este semnalată de secvența AGATAA care este recunoscută de un TF specific-eritroid numit GATA.
- **elementele de răspuns** (RE) care modulează transcripția unor gene în funcție de anumite semnale intra- sau extracelulare („expresie genică indusă").

Aceste semnale pot fi *stimuli externi* (molecule nutritive, concentrația unor ioni, temperatură, șoc etc.) sau *semnale de comunicare* de la alte celule (hormoni, morfogeni) – care activează anumiți FT ce se fixează pe elementele de răspuns ale anumitor gene și determină transcripția lor temporară. De exemplu, HRE – elementele de răspuns la receptorii hormonali nucleari (GRE – glucocorticoizi; ERE – estrogeni etc.) sau CRE – elementul de răspuns la AMPc (*mesagerul secund* prin care acționează diferiți hormoni și alte molecule semnalizatoare).

Tipurile de module (elemente) ce au fost identificate la promotorii a numeroase și diferite gene sunt *în număr limitat*; acest fapt este în contradicție cu numărul mare de gene și reglarea lor foarte fină, în raport cu programul dezvoltării sau cu condițiile externe. Dar promotorii se organizează după principiul „*amestecării și armonizării*" („*mix and match*"): fiecare poate avea mai multe copii ale unui modul în cadrul unui domeniu reglator și mai ales o combinație proprie de module, fapt ce îi conferă o *identitate structurală și funcțională*.

Promotorul este de obicei unic, dar multe gene au *promotori multipli (alternativi)* – unii mai puternici alții mai slabi, care vor determina transcripte ce diferă prin extensia capătului 5'.

Mutațiile care interesează secvențele promotorului nu modifică structura de aminoacizi a proteinei codificate de genă, ci numai *nivelul* ei de expresie (rata sintezei). De exemplu, mutații în regiunea reglatoare 5' a genei pentru beta-globină reduc sinteza catenelor beta la adult, producând boala denumită *beta-talasemie* și/sau creșterea expresiei catenelor gama în afecțiunea denumită *persistența ereditară a hemoglobinei fetale*.

(2) Alte elemente de reglare din regiunea 5'

La distanță de STS se pot găsi în regiunea 5' și alte elemente de reglare care determină de obicei locul, momentul și mai ales intensitatea transcripției. Poziția

BUCHAREST MEDICAL UNIVERSITY LIBRARY

şi orientarea lor sunt variabile (uneori la mii de nucleotide faţă de SST), pot sa fie plasaţi pe catena opusă sau în regiunea de reglare 3' şi chiar în alte molecule de ADN (cromozomi). După fixarea *factorilor de transcripţie specific tisulari*, ADN face o buclă şi regiunea de reglare se plasează în apropierea promotorului, permiţând interacţiunea cu *complexul transcripţional bazal*, format de ARN polimerază şi *factorii de transcripţie generali.*

- **Activatorii** („enhancers") sunt elemente de reglare pozitivă care amplifică nivelul bazal al transcripţiei, iniţiată de promotor. Funcţia lor nu depinde de localizare sau orientare, fiind determinată mai ales de fixarea unor factori de transcripţie specifici anumitor ţesuturi (stimulează activitatea unor gene specifice, de exemplu, cele pentru *imunoglobuline*).
- **Inhibitorii** („silencers") reduc nivelul transcripţiei şi uneori reprezează funcţia unor gene.
- **Locus control regions** (LCR) sunt elemente cis-reglatoare situate la distanţă de un grup de gene care se exprimă într-un anumit ţesut, dar în diferite perioade ontogenetice (de exemplu familia alfa- sau beta-globinei).
- Acţiunea activatorilor şi inhibitorilor este *limitată* la o anumită genă sau un grup de gene de către nişte secvenţe **izolatoare** („insulators") care blochează răspândirea efectului unor „agenţi" ce intensifică sau atenuează transcripţia.

b) Regiunea de reglare 3'

Orice genă se termină în regiunea 3' cu o secvenţă netranscrisă, care flanchează „cadrul de lectură a genei" sau zona ei centrală. Această secvenţă este *imprecis delimitată şi cunoscută*, dar existenţa ei certă îi conferă teoretic un rol structural sau funcţional. În această regiune se găsesc *secvenţe-semnal* care afectează procesarea, stabilitatea şi durata de viaţă a ARNm. La unele gene (de exemplu, gena beta-globinei) în această regiune 3' a genei se pot găsi secvenţe reglatoare de tip activator (*enhancer*), iar la alte gene se găsesc situsuri de fixarea a micro ARN ce intervine în reglarea expresiei genelor.

2. Gene comune şi gene specifice

Genele ce codifică proteine se clasifică în *gene comune*, care sunt exprimate în toate celulele, şi *gene specifice*, exprimate numai în anumite tipuri celulare şi/ sau în anumite momente specifice.

a) Gene comune

Un grup restrâns de gene codifică proteine comune, ubicuitare, indispensabile menţinerii structurilor şi funcţiilor celulare. De exemplu: proteine membranare, citoscheletice, cromozomiale sau proteine implicate în replicarea ADN, sinteza proteică, producerea de energie, metabolismele intermediare. Firesc, ele *se exprimă în toate celulele* şi se numesc **gene comune**/ ubicuitare sau „*gene menajere*" (*domestice*, de la *housekeeping genes*, în terminologia engleză).

Genele comune au următoarele caracteristici:

- reprezintă circa *1/5 din numărul total* de gene la om şi peste 90% din genele exprimate în orice tip celular;
- se află în majoritatea lor în regiunile de ADN relativ bogate în GC, deci în benzile cromozomiale alcătuite din *eucromatină* (benzile R);
- promotorul este alcătuit din una sau mai multe secvenţe de tip GC box, situsuri la care se fixează un *factor special de iniţiere a transcripţiei* (Sp 1);
- transcripţia lor este de obicei *continuă* (permanentă), dar la un *nivel scăzut*;
- conţin în regiunea 5' (dar şi în alte zone) numeroase repetiţii ale dubletului 5'-CpG-3' (hipometilat sau nonmetilat, contrar regulii generale); ele alcătuiesc insule CpG sau „*insule HTF*" (*insule* – în sensul de grupări; *HTF* de la „*Hpa Tiny Fragments*", deoarece situsurile CGCG pot fi recunoscute şi clivate de enzima de restricţie *Hpa* II).

b) Gene specifice

Circa 4/5 dintre genele umane au o expresie limitată spaţial sau temporal. *Limitarea spaţială* înseamnă exprimarea specifică în anumite ţesuturi (de exemplu, neuronal, muscular etc.), în anumite linii celulare (de exemplu, celulele derivate din creasta neurală), în anumite tipuri celulare (de exemplu, celule eritroide) şi chiar celule individuale (de exemplu, limfocitele B, neuronii olfactivi). Acest proces implică intervenţia unor mecanisme particulare de reglare a expresiei genice şi stă la baza diferenţierii sau specializării celulare. *Limitarea temporală* se referă la expresia unor gene în anumite stadii (momente specifice) ale dezvoltării, diferenţierii sau ciclului celular.

3. Gene unice şi familii de gene

3.1. Gene unice sau cvasiunice. Pseudogene

Marea majoritate a genelor sunt reprezentate de **gene unice** (mai exact, două copii alelice prezente în genomul diploid) al căror plan structural coincide cu cel descris anterior.

Unele gene au fost însă *duplicate* în cursul evoluţiei: uneori, cele două copii sunt cvasiidentice şi pot fi folosite aleatoriu în transcripţie, când una, când alta (de exemplu, genele $\alpha 1$ şi $\alpha 2$ pentru alfa-globină); alteori, cele două copii au suferit mici modificări care nu le alterează funcţia, iar expresia lor individuală

CASETA 3.3

Familiile alfa şi beta globinei

Genele hemoglobinei, sunt repartizate în două familii, situate pe cromozomi diferiţi: familia alfa-globinei şi familia beta globinei (figura 3.14.a.). Toate genele au aceeaşi structură, fiind alcătuite din 3 exoni şi 2 introni, şi au apărut prin duplicaţii succesive dintr-o genă ancestrală (figura 3.10).

***Familia genelor alfa-globinei** este situată la capătul distal al braţului scurt al cromozomului 16 (locus HBA din 16p13); este alcătuită din patru gene funcţionale: zeta (ζ), alfa 2 (α2), alfa 1 (α1) şi teta (θ) – care produc fiecare un polipeptid de 141 aminoacizi. Familia alfa globinei conţine de asemenea 3 pseudogene (ψ), nefuncţionale. Ordinea genelor în familia α-globinei (descrise în direcţia 5' → 3') este următoarea: ζ- ψζ- ψα^1 - ψα^2 - α^2 - α1 - θ. Gena zeta (ζ) se exprimă numai în perioada embrionară (figura 3.14); genele alfa 2 şi alfa 1 încep să se exprime în perioada fetală şi rămân active toată viaţa (produc proteine identice şi contribuie în mod egal la sinteza catenei alfa-globinei); gena teta este o pseudogenă funcţională, dar produsul său proteic nu a fost încă identificat în condiţii fiziologice.*

***Familia genelor beta-globinei** se află la extremitatea distală a braţului scurt al cromozomului 11 (locus HBB din 11p15); conţine cinci gene funcţionale: epsilon (ε), gama (γ)-G, gama (γ)-A, delta (δ) şi beta (β), care codifică fiecare un peptid de 147 aminoacizi. Există o singură pseudogenă. Ordinea genelor ce alcătuiesc familia beta-globinei este următoarea: ε - ^{G}γ - ^{A}γ - ψβ - δ - β. Gena epsilon este activă în perioada embrionară (formând hemoglobinele embrionare: Hb Gower 1 - ζ2ε2 şi Hb Gower 2 - α2ε2); genele gama se exprimă în perioada fetală (formând Hb fetală Hb-α2γ2), dar imediat după naştere transcripţia lor se diminuează brutal fiind înlocuită de sinteza lanţurilor beta şi producerea de Hb A (α2β2); în aceeaşi perioadă începe să funcţioneze şi gena delta care va participa la sinteza Hb A2 (α^{2}δ^2) dar expresia sa este slabă (Hb A2 = 2%). Se remarcă faptul că genele globinei se exprimă în diferite perioade ontogenetice în ordinea 5'→3' în care se găsesc pe cromozom (figura 3.14.b).*

se face fie în diferite perioade de ontogeneză (de exemplu, genele pentru catenele de globină ε, γ, δ şi β) (caseta 3.3), fie în ţesuturi/organe diferite (de exemplu, genele pentru amilaza salivară sau pancreatică) sau în compartimente celulare diferite (genele pentru izoenzimele citoplasmatice şi mitocondriale).

Ca urmare a unor mutaţii inactivatoare, unele copii produse prin duplicaţia genelor[17] devin nefuncţionale; dacă ele cuprind întreaga structură a genei se numesc **pseudogene** (se notează cu litera grecească psi- ψ) iar dacă sunt alcătuite numai dintr-o parte a genei se numesc **gene trunchiate** sau **fragmente de genă.** De exemplu, gena *NF1* (neurofibromatoza tip I), situată pe 17q11.2 are cel puţin 11 pseudogene sau fragmente de genă localizate în regiunile pericentromerice a şapte cromozomi diferiţi; gena *PKD1* (ce produce ADPKD sau boala polichistică renală dominant autozomală) situată pe 16p13.3 are în imediata ei vecinătate trei copii trunchiate a circa 70% din gena normală. Probabil singura pseudogenă funcţională este *gena θ pentru globină* (din familia β globinei; figura 3.14.a): ea codifică un polipeptid care însă nu este încorporat într-o moleculă funcţională de hemoglobină.

3.2. *Familii şi superfamilii de gene*

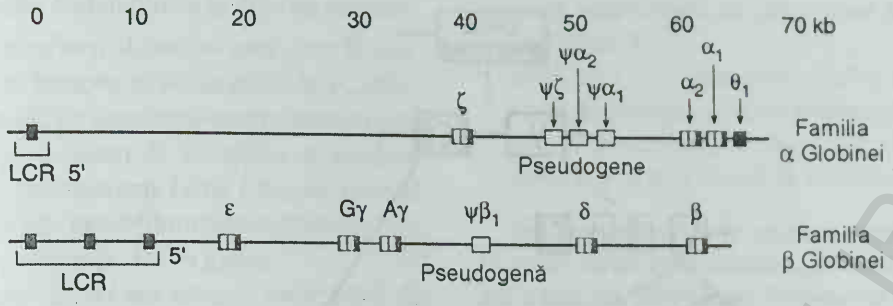
În genomul uman există numeroase gene funcţionale care prezintă un grad mai mare sau mai mic de secvenţe similare. *Genele cu structuri asemănătoare* alcătuiesc **familii de gene.** În funcţie de gradul de înrudire al secvenţelor pe care le au membrii familiei, se pot deosebi mai multe tipuri.

a) Familii „clasice" de gene

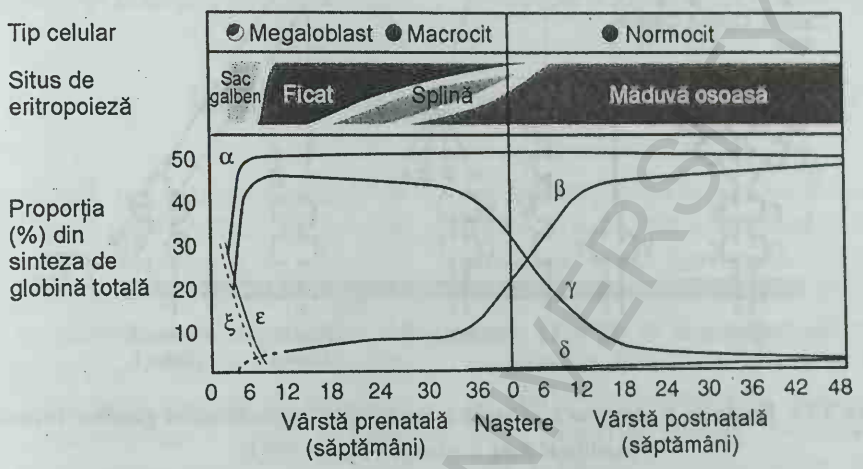
Genele ce alcătuiesc o astfel de familie au o *structură cvasiidentică* (de exemplu, familia genelor pentru histone şi cea a genelor ARNr) sau foarte asemănătoare (de exemplu, familia alfa sau beta-globinei) (vezi figura 3.14 şi caseta 3.3) şi de aceea se consideră că, foarte probabil, au o *origine comună*, ele rezultând în evoluţie prin duplicaţia succesivă a unei *gene ancestrale* (figura 3.10). Deşi copiile au evoluat apoi independent şi divergent, fiecare continuă să producă proteine relativ asemănătoare, structural şi funcţional. Unele gene din familie pot să nu funcţioneze, formând pseudogene.

Elementele ce compun o familie de gene pot fi uneori *dispersate* în genom (de exemplu, familia genelor pentru colagen, actină, miozină ş.a.); alteori, ele sunt *grupate* („clusters") foarte aproape una de alta,

17. Pseudogenele pot să apară şi prin retrotranspoziţie: ARNm produs de o genă activă formează sub acţiunea transcriptazei inverse o copie de ADNc care se inseră în ADN; neavând promotor această copie este nefuncţională.



a



b

Figura 3.14. Structura şi expresia genelor globinelor

(modificat după Kaplan şi Delpech, 1993; Hoffee, 1998)

a) Familiile alfa şi beta-globinei; toate genele gobinelor sunt alcătuite din trei exoni separaţi de doi introni. Poziţia genelor în cromozomi corespunde ordinii de activare în cursul dezvoltării ontogenetice; b) Expresia genelor globinelor în cursul vieţii

într-o anumită regiune a unui cromozom (de exemplu, familiile genelor globinei, ale hormonului de creştere ş.a.) sau în mai mulţi cromozomi (de exemplu, familiile genelor pentru histone, genelor pentru receptorii olfactivi).

b) Familii de gene ce codifică produse cu domenii mari, identice („conservate")

În acest grup sunt incluse, printre altele, familiile care codifică *factori de transcripţie* (de exemplu, familiile genelor *HOX*, *PAX*, *SOX*, *POU* etc., ce intervin în embriogeneză). Proteinele corespunzătoare au în comun o regiune similară, cu secvenţa aminoacidică foarte conservată, ce formează *un domeniu/motiv* al proteinei, cu care aceasta se fixează în regiunea promotoare a genei-ţintă (de exemplu, domeniul *homeobox* pentru genele *HOX*).

c) Familii de gene ce codifică proteine cu un motiv scurt de aminoacizi identici

În acest caz, membrii familiei au o structură diferită, exceptând o secvenţă scurtă, identică, de aminoacizi care va determina o funcţie asemănătoare (de exemplu, familia ankirinei implicată în interacţiuni proteină-proteină).

d) Superfamilii de gene

O genă ancestrală poate forma printr-un fenomen de hiperduplicaţie, produs timpuriu în evoluţie, un număr mare de copii genice care, evoluând divergent, vor prezenta structuri şi funcţii diferite. Totuşi, ele vor mai păstra un *„motiv" structural identic* şi vor interveni în procese corelate. Cel mai cunoscut şi mai frumos exemplu îl reprezintă **superfamilia genelor imunităţii**, care include genele pentru imunoglobuline, genele pentru receptorii limfocitelor T, genele complexului major de histocompatibilitate (*HLA*), dar şi alte gene implicate în recunoaşterea celulară în sistemul nervos (genele pentru moleculele de adeziune celulară sau pentru glicoproteinele asociate cu mielina) (vezi capitolul 17). Toate aceste gene conservă structura terţiară a unităţii de bază (figura 3.15). Un alt exemplu de superfamilie îl reprezintă genele ce codifică **receptorii nucleari pentru hormoni**.

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

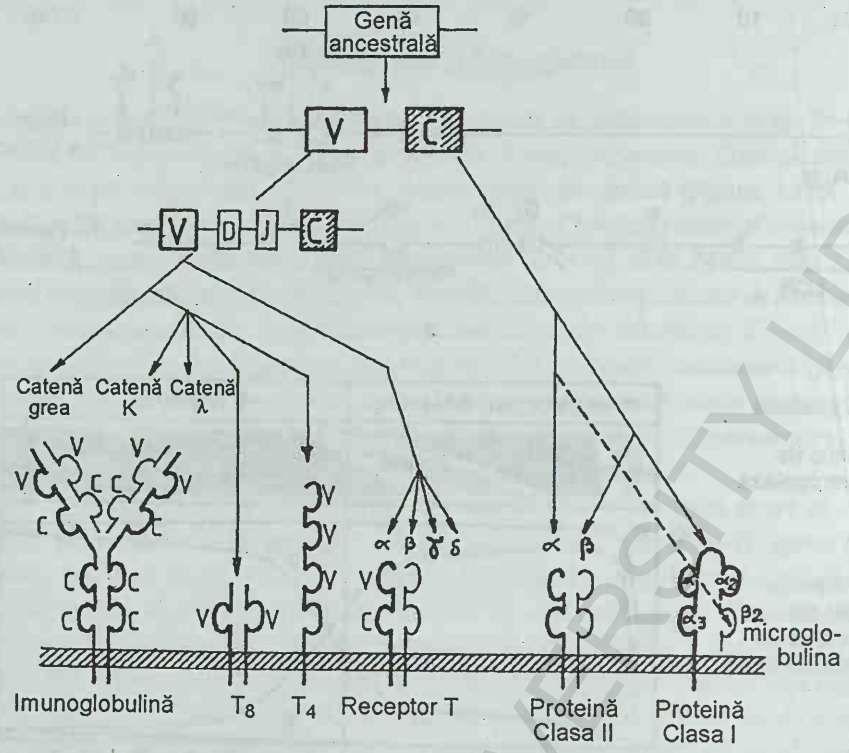


Figura 3.15. Evoluția și structura actuală a membrilor superfamiliei genelor imunității

(modificat după Kaplan și Delpech, 1993)

V – gena pentru partea variabilă a lanțurilor de Ig; C – gena pentru partea constantă a lanțurilor de Ig; D – gena de diversitate; J – gena de joncțiune

4. Elementele genetice mobile

Genele nu au întotdeauna o poziție fixă în genom. Unele secvențe de ADN sunt capabile să își schimbe localizarea în genom, fără să apară însă niciodată în formă liberă și individualizată în celulă. Deplasarea unor secvențe de ADN dintr-o poziție în alte poziții în genomul unei celule a fost numită **transpoziție**, iar secvențele respective *elemente genetice mobile, elemente transpozabile* sau **transpozoni**.

Transpozonii au fost identificați inițial la porumb (Barbara McClintock, Premiul Nobel, 1983) și, ulterior, la numeroase specii de procariote și eucariote, plante și animale; deși mai puțin frecvenți la mamifere, existența lor a fost recunoscută inclusiv la om.

În funcție de mecanismul transpoziției, transpozonii (Tn) sunt de două feluri:

- *Tn de clasă I* – **retrotranspozoni, retropozoni** sau *retroelemente* – care se copiază ei înșiși: mai întâi sunt transcriși în molecule de ARN, apoi sub acțiunea unei *transcriptaze inverse* (codificată adesea de Tn respectiv) aceste molecule vor forma copii complementare (de tip ADNc) care se vor insera (sub acțiunea unei *endonucleaze*) într-un alt loc în genom. Retrotranspozonii alcătuiesc marea majoritate a elementelor transpozabile la om; totuși, în prezent, numai o mică parte din aceste *retroelemente* mai sunt capabile de transpoziție.
- *Tn de clasă II* se deplasează *direct* dintr-o poziție în alta folosind o enzimă („*transpozază*", codificată de Tn) care „taie" ADN în alt loc din genom; Tn se inseră în această breșă și apoi capetele sale se sudează la ADN (prin acțiunea „rezolvazei", o altă enzimă codificată de Tn).

Transpozonii produc o clasă distinctă de **ADN repetitiv** care a determinat *„expansiunea" genomului* organismelor complexe (formând circa 45% din genomul uman). La mamifere și om, au fost identificate patru tipuri de elementele transpozabile (care vor fi prezentate ulterior în detaliu):

- elemente nucleare dispersate lungi (LINEs – de la *Long interspersed nuclear elements*);
- elemente nucleare dispersate scurte (SINEs – de la *Short interspersed nuclear elements*), reprezentați în special de familia *Alu;*
- retrotranspozoni LTR (elemente asemănătoare retrovirusurilor, care au la capete *long terminal repeats* sau LTR);
- transpozoni ADN „fosili" (asemănători cu Tn bacterieni).

Primele trei tipuri sunt Tn de clasă I (*retrotranspozoni*), iar tipul patru sunt Tn de clasă II.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Transpozonii au fost implicaţi în diferite procese:

- *modificarea structurii şi funcţiei unei gene* în care se inserează un transpozon; acesta aduce fie o „informaţie" anormală, fie o secvenţă-control nepotrivită; au fost descrise cazuri de hemofilie A produse prin inserţia unei secvenţe *LINE 1* într-un exon al genei şi cazuri de neurofibromatoză produse prin inserţia unei secvenţe *Alu în genă*;
- *transferul unor exoni sau chiar a unor copii de gene* ce pot fi eventual procesate dacă sunt inserate lângă un promotor; de exemplu, au fost descrise copii autozomale ale unor gene situate pe cromozomul X;
- realizarea unor „puncte fragile" în cromozomi, la locul de inserţie; ruperea cromozomilor în aceste puncte şi rearanjările ulterioare ale materialului genetic pot juca un rol în evoluţie.

Existenţa elementelor genetice mobile, care încă nu şi-au dezvăluit toate secretele, dovedeşte că genomul are o anumită *plasticitate*. Fenomenul nu se limitează numai la aceste elemente deoarece rearanjările ADN se întâlnesc şi în funcţionarea genelor imunoglobulinelor.

C. Structura genomului uman

În concepţia clasică, la eucariote, termenul de **genom** (introdus în anul 1920 de Hans Winkler,) se referă la *setul complet de cromozomi din gameţi*. În genetica moleculară semnificaţia noţiunii de genom a fost extinsă la „*ansamblul informaţiei ereditare din ADN unei celule sau al unui organism*" (Wikipedia). Deci, genomul include genele şi secvenţele necodante din ADN nuclear („*genom nuclear*" – mare şi complex) şi ADN mitocondrial („*genom mitocondrial*" – mic şi simplu). În realitate, termenul de **genom uman** se utilizează astăzi cel mai frecvent pentru *informaţia din ADN cromozomial*, iar secvenţierea genomului uman înseamnă determinarea secvenţei nucleotidice a 24 molecule de ADN diferite: 22 autozomi +X+Y, una pentru fiecare cromozom.

Termenul de genom nu se referă la informaţia genetică a unui singur individ (numită genotip sau „*genom personal*"), ci la *ansamblul de secvenţe ADN*, codante sau necodante, identice la toţi indivizii speciei („*genom de referinţă*"); deci genomul nu include diversitatea sau polimorfismul genetic al indivizilor speciei. Precizăm de asemenea că pentru a se face distincţia dintre genomul gameţilor şi cel al celulelor somatice se folosesc termenii de *genom haploid* şi *genom diploid*.

Cunoştinţele despre genomul uman au fost dependente în timp de metodele folosite. Descoperirea tehnologiei ADN recombinant a marcat începutul unei perioade revoluţionare pentru biologie în general şi medicină în special. În 1980 a apărut ideea cartografierii genice şi *secvenţierii întregului genom uman*, care treptat a început să prindă contur, devenind în 1990 **Proiectul Genom Uman** (PGU). Coordonarea cercetărilor în acest mega-proiect internaţional de cercetare a fost realizată de *Human Genome Organization* (*HUGO*) şi a inclus 20 de centre din 6 ţări (SUA, Marea Britanie, Franţa, Germania, Japonia şi China), reunite în *International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC)*. Prima „schiţă de lucru" (*draft*), incompletă şi imperfectă, a fost terminată, după numai 10 ani, în iunie 2000 şi publicată la 15 februarie 2001. Versiunea finisată, foarte precisă, considerată „aproape finală" a fost anunţată în aprilie 2003 (pentru a comemora 50 de ani de la descoperirea structurii ADN) şi publicată în 2004.

Secvenţierea genomului uman a determinat „naşterea" **genomicii umane** – ştiinţa care *studiază structura şi funcţia genomului uman, reglarea şi interacţiunile genelor şi variantelor genomice, precum şi rolul lor în sănătate şi boală.*

1. Date generale despre genomul uman (cunoscute înainte de iniţierea PGU, 1990)

1.1. Mărimea genomului uman

Cantitatea totală de ADN din celulele umane diploide a fost apreciată la 3,5 picograme per genom haploid şi corespunde teoretic la circa 3,2 miliarde de perechi de baze (gigabaze). Mărimea genomului haploid este *constantă* la fiecare specie şi se mai numeşte **valoare C**; ea prezintă evident variaţii în cursul ciclului celular: 2 C la sfârşitul diviziunii şi faza G1, 4 C după replicarea ADN, în faza S şi în G2.

Nu există însă o concordanţă între valoarea C, numărul de gene şi complexitatea unei specii („*paradoxul valorii C*"); spre exemplu, protozoarul *Trichomonas* are de trei ori mai multe gene decât omul, deşi are un genom de trei ori mai mic.

1.2. Fragmentarea genomului uman

Nucleul celulelor umane conţine peste 99% din ADN celular. Această cantitate enormă de ADN este

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fragmentată în 24 de tipuri distincte de *molecule liniare de ADN* care, prin *asociere cu proteine*, formează *cromozomii*: 22 de tipuri distincte de *autozomi* şi doi cromozomi sexuali, X şi Y. Fiecare cromatidă conţine *o singură moleculă de ADN* ce formează împreună cu proteinele histonice şi nehistonice o structură supramoleculară numită **cromatină**. Această structură şi organizare spaţială este crucială pentru funcţia genomului, deoarece reglează expresia genică; să ne reamintim (vezi capitolul 2B) că *eucromatina* este puţin condensată, activă genetic (transcripţional) şi conţine genele ce codifică proteine, iar *heterocromatina* este puternic condensată, inactivă genetic şi, foarte probabil, lipsită de gene.

Cei 24 de cromozomi diferă prin lungime (de la 250 Mb pentru cromozomul 1 la 48 Mb pentru cromozomul 21), poziţia centromerului şi modelul caracteristic de benzi – de culoare închisă sau deschisă – ce reflectă o structură, compoziţie şi organizare internă (eucromatină şi hetrocromatină) *specifică pentru fiecare cromozom.*

1.3. Heterogenitatea secvenţelor nucleotidice ale ADN

În genomul uman există mai multe *clase de ADN*, diferite prin repetiţia secvenţelor nucleotidice: ADN nerepetitiv, ADN moderat repetitiv şi ADN înalt repetitiv.

a. ADN nerepetitiv

ADN nerepetitiv (60%) este alcătuit din *secvenţe unice per genom* sau într-un număr foarte mic de exemplare (formând *familii multigenice*); se găseşte mai frecvent în regiunile cromozomiale bogate în eucromatină. Doar o mică parte din ADN nerepetitiv alcătuieşte regiunile codante ale genelor (exonii) pentru proteine. Restul ADN-ului nerepetitiv este *necodant* şi se găseşte în interiorul genei (*introni, secvenţe reglatoare*) şi în regiunile extragenice.

b. ADN moderat repetitiv

ADN moderat repetitiv (30%) este alcătuit din *secvenţe scurte*, de 300-1000 pb (rar mai mari), *repetate* de zeci sau sute de ori şi *dispersate* în genom. Majoritatea secvenţelor moderat repetitive *sunt transcrise în ARN* şi formează frecvent „*familii*" de secvenţe înrudite, unele cu funcţie cunoscută (*copii multiple ale unor gene*[18]): pentru ARNr, ARNt, histone, receptori olfactivi, ubiquitină), altele cu funcţie necunoscută (de exemplu, secvenţele SINEs sau LINEs). Despre toate acestea vom discuta după descrierea PGU, care a adus numeroase informaţii noi în acest domeniu.

c. ADN înalt repetitiv

ADN înalt repetitiv (10% din genom) este alcătuit din *secvenţe foarte scurte* (2-200 pb), *repetate în tandem* (→→→→)[19], de *mii* de ori; ele *nu sunt transcrise în ARN.*

Unele secvenţe de ADN înalt repetitiv, numite si **ADN satelit**[20] (α, β, 1, 2, 3) alcătuiesc „*blocuri mari*" de heterocromatină constitutivă situate în anumite regiuni cromozomiale: centromer, telomere, constricţii secundare, benzile G pozitive (colorate) etc.; ele au evident un *rol structural* (vezi capitolul 2 B).

O altă parte de ADN înalt repetitiv corespunde unor secvenţe mici, repetate în tandem, ce formează „*miniblocuri*" *dispersate* în toţi cromozomii, cu o dispoziţie şi mărime foarte *variabilă* de la o persoană la alta; de aceea au fost numite **VNTRs** („*variable number tandem repeats*") sau **SSRs** (de la „*simple sequence repeats*")[21] cu două familii principale: minisateliţii şi microsateliţii.

- **Minisateliţii** sunt constituiţi din repetiţii în număr variabil a unei *secvenţe scurte* (10-60 pb) ce formează segmente (de 1-20 kb) *dispersate* (în peste 1.000 de localizări) în toţi cromozomii (excepţie X şi Y), ocupând anumite *situsuri precise*, inclusiv telomerele, diferite de la o persoană la alta.
- **Microsateliţi** (numiţi şi **STRs**, de la „*short tandem repeats*" sunt formaţi de regulă din *repetiţii foarte scurte* (1-6 pb), frecvent dinucleotidice (în special CA sau TA) sau trinucleotidice, ce formează foarte numeroase segmente mai mici de 100 pb, foarte polimorfice, cu o distribuţie uniformă în genom (un microsatelit la 1.000 pb). Interesant este faptul că microsateliţii pot fi *instabili*: repetiţiile dinucleotidice variază în diferite ţesuturi la aceiaşi persoană, iar repetiţiile trinucleotidice variază de la o generaţie la alta (se amplifică prin meioză).

Datorită polimorfismului foarte înalt, minisateliţii şi microsateliţii sunt nişte veritabili *markeri genetici individuali* care prin determinarea modelului dispoziţiei lor realizează un *profil genetic specific* ce constituie **amprenta genetică** a unui individ folosită în medicina legală pentru identificarea persoanelor[22] (Alec Jeffrey,

18. Repetiţiile unor gene importante ar putea fi o modalitate de protecţie şi chiar de reparare.
19. **Repetiţiile în tandem** sunt adiacente, una după alta (cap-coadă), şi variabile ca număr de nucleotide şi ca număr de unităţi repetitive.
20. **ADN satelit** a fost denumit astfel deoarece după centrifugarea ADN celular în gradient de densitate, acest tip de ADN formează o bandă „*satelit*" faţă de majoritatea ADN.
21. Termenul de *SSR* a fost introdus de IHGSC, 2001, la descrierea schiţei genomului uman – unde se precizează că SSRs cu unitatea de repetiţie de 1-13 nt sunt numiţi şi *microsateliţi*, iar SSRs cu unitatea de repetiţie de 14-500 nt sunt numiţi şi *minisateliţi*.
22. Probabilitatea întâlnirii a doi indivizi identici, dar neînrudiţi, cu aceiaşi distribuţie este mai mică de 10^{-20}.

RAZVAN CHIRIAC UNIVERSITY LIBRARY

1985), sau pentru determinarea paternităţii – pe baza principiului „potrivire identică şi potrivire ereditară" (caseta 3.4). Microsateliţii se mai folosesc în studii populaţionale.

1.4. ADN genic şi extragenic

a) ADN genic

Gena a fost definită în genetica moleculară ca fiind *o unitate de transcripţie ce determină un produs funcţional*, o proteină sau o moleculă de ARN. Primele estimări ale numărului de gene la om variau între 80.000 şi 100.000; aşa cum vom vedea ulterior, aceste cifre erau suprapraevaluate. Tehnicile de analiză moleculară au evidenţiat *structura discontinuă* a genei, alcătuită dintr-o *regiune centrală*, transcrisă şi formată prin alternanţa unor secvenţe codante, translate, (exoni) şi necodante (introni), flancată de două *regiuni reglatoare 5' şi 3'* (vezi capitolul 3B). Majoritatea genelor sunt reprezentate de *gene unice*, comune sau specifice unui anumit tip celular; există însă şi *familii de gene*, cu structuri şi funcţii asemănătoare. Unele gene şi-au pierdut funcţia, datorită unor mutaţii inactivatoare, constituind *pseudogenele*.

b) ADN extragenic

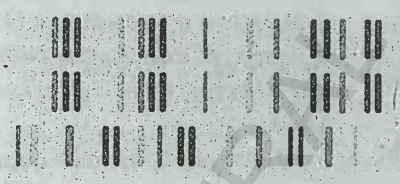
ADN extragenic, mult mai amplu decât ADN genic, este alcătuit din secvenţe unice sau repetitive (grupate în „*blocuri*", sau *dispersate* în genom). Rolul ADN extragenic era neclar deoarece aceste secvenţe erau considerate *inactive trasncripţional* şi mulţi cercetători le-au catalogat ca fiind elemente „fosile", martori ai evoluţiei, fără nici o funcţie, numindu-le ADN

CASETA 3.4

Profilul ADN sau „amprenta genetică"

*Determinarea **profilului ADN** sau genetic (amprenta genetică) este o metodă folosită în medicina legală pentru identificarea persoanelor pe baza markerilor individuali ADN (în criminalistică, accidente/ dezastre) şi determinarea paternităţii sau filiaţiei.*

Deşi 99,9% din secvenţele ADN sunt identice la toate persoanele, există secvenţe repetitive foarte variabile (VNTR) care au un număr de repetiţii specific pentru o anumită persoană – un fel de „cod de bare".



Probă de la locul crimei

Suspect 1

Suspect 2

Metodele actuale de determinare a profilului genetic individual al acestor markeri se bazează pe PCR şi electroforeză capilară, stabilind combinaţia numărului de „repetiţii în tandem scurte" (STR) – de 2-5 nucleotide (majoritatea de 4 nt) sau microsateliţi – situaţi în anumite localizări genomice. În America de Nord sau Franţa se foloseşte sistemul CODIS 13 (Combined DNA Index System) ce determină identificarea numărului de repetiţii corespunzătoare a 13 STR situaţi pe diferiţi cromozomi (figura 3.16.a).

Pentru fiecare locus o persoană are 2 alele (de exemplu, 6 şi 10 repetiţii) şi prin analiza a 13 loci/ markeri se realizează o combinaţie specifică, „un profil genetic unic" caracteristic unei anumite persoane. Folosirea STR pentru identificarea persoanelor sau paternitate/filiaţie se bazează pe două principii: „potrivire identică" – acelaşi model alelic pe două probe de la acelaşi individ – şi „potrivire ereditară" – fiecare alelă STR se transmite codominant, o persoană primeşte o alelă de la fiecare părinte.

Sistemul CODIS 13

Marker ADN	Mama		Copil		Posibil tată	
D2S11	28	30	28	**31**	29	**31**
D7S820	9	10	10	**11**	**11**	12
TH01	14	15	14	**16**	15	**16**
D13S317	7	8	7	**9**	8	**9**
D19S433	14	16	14	**15**	**15**	17

Determinarea paternităţii

BCU IAŞI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

„*deşeu*" sau „*egoist/inutil*", deoarece nu participa la formarea de proteine. Aşa cum vom vedea ulterior, aceste concepţii s-au schimbat radical după finalizarea PGU.

2. Proiectul genom uman

Lansat în 1990, pentru o durată de 15 ani, Proiectul Genom Uman (PGU) a avut ca **obiective principale** secvenţierea genomului uman haploid (22A+X+Y ≈ 3,2 Gb) constând în identificarea, şi localizarea genelor ce alcătuiesc genomul uman. În esenţă, se spera că prin cunoaşterea aprofundată a structurii (*anatomiei*) genomului uman (denumit metaforic „*cartea vieţii*") se vor afla multe lucruri importante pentru biologie, în general, şi pentru medicină, în special.

Realizarea proiectului s-a confruntat cu două mari probleme:

- *probleme tehnice, metodologice şi logistice* ale procesului de secvenţiere, ţinând cont de mărimea genomului uman (în special a ADN intergenic), heterogenitatea structurii sale (în care secvenţele repetitive sunt foarte abundente), complexitatea şi diversitatea elementelor structurale. Depăşirea acestor dificultăţi şi perfecţionarea strategiilor şi metodologiilor au fost posibile prin secvenţierea prealabilă a genomului unor organisme mai simple. Aceasta a permis şi dezvoltarea „genomicii comparative", foarte utilă deoarece „*comparaţia naşte înţelegere*".
- *probleme biologice* foarte dificile deoarece sub aparenta simplitate a unor structuri unidimensionale se ascunde un conţinut informaţional foarte complex, care trebuie descifrat.

Determinarea secvenţei genomului uman sau stabilirea ordinii „liniare" a nucleotidelor în ADN a implicat *trei etape majore*:

- **secvenţierea**[23] unor fragmente mici (circa 800 nt) de ADN folosind două strategii: secvenţierea „clonă cu clonă", în mod ierarhizat, metodă mai precisă, dar mai laborioasă şi deci costisitoare; „secvenţierea globală aleatorie"– „*shotgun integral*" – mai puţin precisă, dar mai rapidă şi mai ieftină; secvenţierea este comparabilă cu „*fabricarea elementelor unui puzzle*";
- **asamblarea genomului**[24] – cu ajutorul unor programe computerizate care ordonează, orientează şi asamblează secvenţele segmentelor mici în *secvenţe continue* din ce în ce mai mari, pentru a crea reprezentarea originală a cromozomului din care derivă; asamblarea genomului este comparabilă cu „*reconstituirea unui puzzle*";
- **adnotarea genomului** – efectuată în doi timpi: (1) identificarea şi localizarea *elementelor structurale ale genomului* (gene cu regiuni codante, reglatoare şi necodante; regiuni intergenice etc.) sau *adnotarea structurală* („*gene finding*"); (2) ataşarea informaţiei biologice (funcţie şi expresie) la aceste elemente sau *adnotarea funcţională*; adnotarea genomului este comparabilă cu „*descifrarea unui text neinteligibil*".

2.1. Schiţa genomului uman (2001)

O primă „schiţă de lucru" a genomului uman a fost gata în iunie 2000 şi publicată la 15 februarie 2001 în două versiuni, în revista Nature de către *IHGSC* şi în revista Science de compania privată *Celera Genomics*. Ambele versiuni raportau secvenţierea a 96% din eucromatină (2,69 Gb) şi erau, firesc, *incomplete şi imperfecte*: o parte importantă din genom rămânea nesecvenţiat (4% din eucromatină şi toată heterocromatina[25], circa 8% din genom), iar partea secvenţiată avea 150.000 de „lacune" (segmente nesecvenţiate). Pentru toţi era evident că mai erau multe de făcut până la secvenţierea completă; cu toate acestea pentru prima oară era posibilă *o perspectivă clară asupra structurii genomului uman.*

Dintre multiplele date obţinute în această „*secvenţiere şi analiză iniţială a genomului uman*" („*build*" – „*construcţia-34*"– *IHGSC*) vom sublinia acum doar trei aspecte:

- ***Secvenţele codante reprezintă mai puţin de 5% din genom***, iar numărul prognozat de gene era cuprins între *30.000 şi 35.000.* Deci genele, ce conţin ADN „codant", sunt pur şi simplu *nişte „insule într-un ocean" de ADN necodant;* această dispoziţie era nu numai surprinzătoare (prin logica „economiei" sau „rentabilităţii"), dar şi misterioasă. Cert este că *genomul nu poate fi considerat o simplă succesiune de gene pe cromozomi, ci o structură cu arhitectură complexă* în care genele sunt dispersate pe cromozomi şi separate prin largi regiuni intergenice, necodante. Acest ADN necodant nu este probabil în totalitate „*inutil*": evidenţierea

23. Secvenţierea diferă de *cartografiere*, care se referă la localizarea pe cromozomi a unor „*puncte sau borne de reper*" reprezentate de gene sau alte elemente structurale.
24. Asamblarea este un proces foarte dificil din cauza suprapunerii secvenţelor unor segmente genomice obţinute aleatoriu, dar mai ales datorită multiplelor secvenţe identice („*repetiţii*") de lungimi şi poziţii diferite în genom, ce nu pot fi secvenţiate, formând lacune („*gaps*"). Ancorarea secvenţelor la o anumită regiune subcromozomială se realizează pe baza unor „hărţi cadru" alcătuită cu markeri genetici (SNPs, microsateliţi, RFLPs) cu o poziţie precisă.
25. Heterocromatina este greu de secvenţiat datorită structurii sale repetitive şi se consideră că nu are gene.

BUPT CENTRAL LIBRARY

unor secvenţe perfect organizate, din care unele sunt transcrise, sugerau că cel puţin o parte din acest ADN ar putea juca un rol, pentru moment necunoscut.

- ***Numărul genelor la om este relativ mic*** dacă îl comparăm cu organismele mai inferioare: 6.000 la o celulă de drojdie, 13.000 la drosofilă, 18.000 la un vierme *C. elegans* (care are numai 1.000 celule) şi 26.000 pentru o plantă. Se pune firesc întrebarea: *ce face atunci diferenţa dintre om şi alte specii?*. Răspunsurile posibile ar fi: poziţia genelor în genom; structura mai complexă (modulară) a genelor şi proteinelor; modul în care „lucrează" genele (mai intens, mai complex) capabile să producă, prin matisare alternativă, mai multe proteine. Diferenţa majoră între om şi alte animale o reprezintă în final *complexitatea proteinelor*, structura lor *modulară* (pe domenii şi motive), care permite combinaţii noi. *„Istoria omului este de fapt o arhitectură nouă realizată cu piese vechi"* (David Baltimore, 2001). La aceasta se adaugă *interacţiunile complexe* dintre proteine şi mecanismele subtile de reglare a sintezei lor. Cert este că înţelegerea complexităţii enorme a fiinţelor umane se confruntă cu enigme a căror dezlegare va fi posibilă doar în viitor.
- ***Genomul a două persoane neînrudite, din populaţii diferite, are în comun 99,9% din secvenţele nucleotidice ale ADN.*** Se spulberă definitiv ideea raselor umane, dar apare o întrebare mai tulburătoare: ce deosebeşte atunci un om de altul, evident la nivelul genomului, făcându-ne pe fiecare dintre noi UNIC? Răspunsul este diferenţa de 0,1% (3 milioane pb) care determină *„variaţii personalizate de secvenţă"*. Această mică parte din genom este alcătuită din secvenţe de ADN de diferite mărimi, *variabile* de la o persoană la alta. *Numărul, poziţia şi structura acestor secvenţe polimorfice sunt caracteristice fiecărui individ.* Analiza schiţei genomului uman arată că oamenii diferă între ei prin circa o pereche de baze la fiecare mie de pb. Acest polimorfism al unui singur nucleotid (SNPs de la *single nucleotid polymorphisms*) reprezintă markerii noştri de individualitate cei mai valoroşi, care participă, mai mult sau mai puţin şi într-un mod încă neelucidat, la determinarea răspunsului la agresiuni (boală) şi a efectului medicamentelor, iar la scară mai mare a abilităţii, memoriei, coordonării fizice, creativităţii etc.

2.2. *Versiunea finisată a genomului uman (IHGSC, 2004)*

Versiunea *„draft"* a genomului uman, incompletă şi imperfectă, trebuia „finisată"; numai *IHGSC* a continuat acest proces şi la 14 aprilie 2003 (sărbătorind 50 de ani de la descoperirea structurii ADN), cu doi ani mai devreme decât era planificat, a fost anunţată prima „versiune finisată" (precizie 99,9%), aproape completă a genomului uman, *„inaugurându-se oficial era genomicii"*; ea a fost publicată în 2004 şi este accesibilă gratuit pe internet (caseta 3.5).

CASETA 3.5

Genomica „in silico"

Realizarea PGU a necesitat dezvoltarea bioinformaticii şi crearea unor baze de date din ce în ce mai puternice, care să permită stocarea cantităţii uriaşe de informaţii, posibilităţi de căutare sistematică şi facilă, precum şi analiza datelor obţinute prin secvenţiere, inclusiv predicţia şi adnotarea genelor sau analiza comparativă la specii diferite; a apărut astfel genomica „in silico" – bazată pe computere, în locul scrierii convenţionale „in papyro".

Pentru a gestiona datele informatizate ale genomicii trebuie folosită o nomenclatură universală a „obiectelor (items)" genomice identificate (de exemplu, numele şi simbolul unic al fiecărei gene, descrierea precisă a diferitelor mutaţii etc.) precum şi corelaţia cu sinonimele sau omonimele utilizate până în prezent.

Un progres important a fost dezvoltarea site-urilor de navigaţie („genome browsers"):

*– **Ensembl** – creat de „European Bioinformaatics Institute (EBI)" şi Wellcome Trust Sanger Institute: www.ensembl.org/Homo_sapiens/indexempluhtlm*

*– **NCBI map viewer** – US National Center for Biotechnology Information (NCBI): www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human*

*– **UCSC genome browser** – University of California at Santa Cruz: www.genome.ucsc.edu/*

Aceste site-uri (gratuite şi permanent actualizate) folosesc pentru navigaţie interfeţe grafice şi instrumente de tip „click-over" care permit utilizatorului să obţină informaţii variate (de la nivelul unei regiuni subcromozomiale până la secvenţa nucleotidică, identificarea genelor şi exonilor, ARN, proteine) şi conexiuni cu alte baze de date.

BCU IASI - CENTRALA UNIVERSITARA

Versiunea finisată (*IHGSC, Build 35*) cuprindea secvența a circa 93% din genomul uman (2,85 miliarde nucleotide dintr-un total estimat la 3,1 Gb), ce corespunde la 99% din genomul eucromatinic și era, evident, o îmbunătățire majoră a *„schiței inițiale"* (2001) (rata de erori era de circa 1 la 100.000 pb, deci de 10 ori mai mică decât în 2001, iar continuitatea de 500 de ori mai bună); au rămas nesecvențiate 341 lacune, ce reprezintă ~7% din întregul genom: ~1% din eucromatină (28 Mb) și ~6% regiunile de heterocromatină constitutivă (~198 Mb), care foarte probabil nu conțin gene.

Dintre numeroasele informații pe care le aduce această versiune finisată vom sublinia, acum, doar pe cele mai relevante și surprinzătoare:

- *Conține cvasitotalitatea genelor ce codifică proteine*, dar numărul lor este mai mic decât în versiunea inițială (cu defecte de secvențiere sau „predicție"), fiind estimat la ~22.500 (variații între 20.000 și 25.000), din care ~19.500 gene cunoscute și restul „prezise"; genele au în total 231.667 exoni (secvențe codante) ce ocupă 35 Mb (1,1%) din genomul eucromatinic; *distribuția genelor în cromozomi este surprinzător de neregulată*: regiuni *„urbane"* cu densitate genică mare și regiuni *„deșertice"* fără gene, numai cu ADN necodant.
- *Creșterea numărului de gene ARN* – „clasice" (ARNr, ARNt, ș.a.) și multe altele „noi" (ARNmi, ARNsi, ș.a) – foarte probabil la fel de numeroase ca genele pentru proteine; rolul lor biologic și „consecințele medicale" rămân a fi elucidate.
- *O parte majoră a ADN necodant, considerat inițial „inutil", pare să aibă funcții importante*, neelucidate complet, numeroase secvențe fiind *transcrise*, iar unele secvențe (5,1 %) fiind *puternic conservate* în evoluție.
- *Rata mutațiilor la bărbați este de două ori mai mare decât la femei,* deoarece celulele germinale efectuează la bărbat un număr mai mare de replicări și diviziuni (în care pot apărea erori) până la formarea spermatozoizilor, comparativ cu formarea ovulelor.
- *S-a descoperit o remarcabilă „plasticitate genomică"* demonstrându-se *„nașterea și moartea"* genelor umane și evidențiindu-se importanța **duplicațiilor segmentare** (5,5% din ADN eucromatinic) drept cauză principală, dar și consecință a plasticității genomului; s-a descoperit un tip nou de polimorfism al ADN, un polimorfism cantitativ, al numărului de copii pentru o secvență dată – denumit **CNP** (*„copy number polymorphism"*) sau **CNV** (*„copy number variations"*); duplicațiile segmentare și CNV au avut un rol important în evoluție și au o contribuție semnificativă la patologia umană, producând (prin *crossing-over* inegal) deleții sau duplicații genice/cromozomiale, care generează *boli genomice*.
- Prin proiectul ELSI (parte componentă a PGU) *au fost puse în discuție numeroase probleme etice* (protecția datelor individuale; comutarea posibilă de la *autonomie* – ca ultim arbitru, la *beneficiul comun și consimțământul deschis* etc.), *sociale* (inegalitatea de acces la aplicațiile testelor moleculare sau genomice" etc.) *și legale* (patentarea datelor, metodelor, genelor etc.).

Finalizarea PGU a reprezentat o etapă fundamentală în progresul medicinii și înțelegerea biologiei și evoluției umane, care inaugurează era genomicii și **medicinii genomice**. Se apreciază că PGU va permite înțelegerea profundă a mecanismelor bolilor la nivel molecular și descoperirea unor noi teste diagnostice sau posibilități terapeutice.

2.3. *Etapele ulterioare în studiul genomului uman*

După publicarea versiunii finisate (2004) a genomului uman, a urmat re-secvențierea cu noi tehnici a fiecărui cromozom; în mai 2006 a fost resecvențiat ultimul cromozom (cromozomul 1, cel mai mare), iar în 2007 secvența întregului genom uman (build 36) a fost declarată „încheiată/terminată"[26] (cu mai puțin de o eroare la 10.000 nucleotide) deși evident vor continua finisări, completări. În august 2009 *Genome Reference Consortium (GRCh)*[27] a publicat versiunea 37-a genomului uman: structura sa este aproape complet descifrată, dar înțelegerea expresiei, funcției și reglării tuturor genelor din genomul uman, rolul ADN intergenic, diferențele dintre indivizi sunt departe de a fi complete.

Ne găsim în etapa de *adnotare a genomului uman* sau faza de „exploatare a genomului" – un proces complex, dificil și de lungă durată, deoarece presupune „decriptarea" secvenței *liniare* a genomului uman, necesară pentru a da „un sens" și interpreta semnificația *diferitelor categorii de secvențe („elemente") genomice*.

Adnotarea structurală implică: recenzarea precisă, identificarea, localizarea și descifrarea structurii tuturor genelor pentru proteine, inclusiv a elementelor reglatoare – denumită *„catalogul părții biologice"*; recenzarea pseudogenelor; recenzarea tuturor

26. Secvențierea genomului este rareori terminată, cu adevărat completă, deoarece există inerente erori și regiuni de heterocromatină, cu ADN înalt repetitiv care rămân nesecvențiate, până la dezvoltarea unor noi tehnologii.
27. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc.

secvenţelor transcrise în ARN necodant, deci care au probabil o funcţie; recenzarea şi interpretarea tuturor tipurilor de ARN funcţional; analiza distribuţiei duplicaţiilor segmentare şi ale tuturor variantelor polimorfice („*variom*"); descifrarea relaţiilor genom-cromatină („*epigenom*"); secvenţierea heterocromatinei (circa 200 Mb) centromerică sau telomerică.

Adnotarea funcţională[28] sau înţelegerea expresiei, funcţiei[29] (biochimice şi biologice) a produselor genomului, ARN şi proteine, al căror ansamblu constituie *transcriptomul şi proteomul* – care formează împreună cu genomul o *reţea biologică* foarte complexă („*interactomul*"), care funcţionează specific în context spaţial şi temporal (caseta 3.6).

Procesul complex al adnotării structurale şi funcţionale a genomului uman a generat mai multe proiecte ce se desfăşoară în paralel:

- **ENCODE** (ENCyclopedia Of DNA Elements) – identificarea şi adnotarea tuturor elementelor funcţionale ale genomului uman;
- **HapMap Project** – realizarea unei hărţi haplotipice a genomului uman care cuprinde modelele comune ale variaţiei genetice, în special SNPs, necesare pentru a stabili modul în care aceste variante pot influenţa sănătatea, predispoziţia la boli şi răspunsul la factori de mediu şi medicamente;

CASETA 3.6

Lumea „omică" şi medicina sistemică

Studiul structurii, organizării şi funcţiei genomului uman se numeşte ***genomică****. Genomica structurală analizează secvenţele „informative" din genom: gene, secvenţe reglatoare, repetitive etc. Genomica funcţională studiază funcţia acestor secvenţe la nivel de transcriptom şi proteom. Transcriptomul este setul de transcripte, molecule de ARN codante sau necodante, produse într-o celulă/ţesut/organ într-un anumit moment al vieţii; el reflectă genele care sunt exprimate în acel moment.* ***Transcriptomica*** *studiază cu diferite metode (microreţele de expresie a ADN; secvenţiere ARN) profilul expresiei genice. Proteomul reprezintă ansamblul de proteine sintetizate/exprimate într-un organit celular, celulă, ţesut, organ care asigură funcţia structurii respective. Studiul funcţiei unor structuri pe baza expresiei globale a proteinelor (cu ajutorul electroforezei bidimensionale, cromatografiei, spectrofotomentriei de masă) se numeşte* ***proteomică****. Transcriptomul şi proteomul sunt dinamice (genomul este fix), variază temporal şi spaţial precum şi în anumite condiţii de mediu. Între proteinele care formează proteomul sau între proteom şi alte molecule (de exemplu, ADN) se produc interacţiuni complexe; reţeaua acestor interacţiuni formează interactomul, iar studiul lor se numeşte* ***interactomică****. Sub acţiunea proteinelor/enzimelor în celule, ţesuturi, organe rezultă un ansamblu caracteristic de produse intermediare sau metaboliţi numit metabolom; studiul tuturor metaboliţilor ce iau parte la un proces biologic se numeşte* ***metabolomică****. Studiul tuturor fenotipurilor exprimate de o celulă, ţesut, organ, organism („fenom") se numeşte* ***fenomică.***

Genomică
↓
Transcriptomică
↓
Proteomică
↓
Interactomică
↓
Metabolomică
↓
Fenomică

Lumea „omică" este organizată ierarhic, pe baza relaţiilor dintre diferite componente. Ele formează reţele funcţionale şi reglatorii la toate nivelurile de organizare: molecule, celule, ţesuturi, organe, organism. Integrarea informaţiilor (obţinute cu diferite metode) ne permit să înţelegem funcţionarea sistemelor biologice.

Din perspectiva ***biologiei sistemelor*** *(sau reţelelor) dezvoltarea, fiziologia şi boala sunt văzute ca procese (interacţiuni) dinamice a unor reţele de componente efectoare şi reglatoare care operează diferit în spaţiu şi timp. Din această perspectivă integrativă, boala este considerată o perturbarea a unui sistem (reţele) normale şi nu ca o disfuncţie a unui/unor module componente. Înţelegerea, depistarea/diagnosticul şi tratamentul bolilor se vor axa pe identificarea şi manipularea reţelelor perturbate global şi nu a componentelor afectate.*

În plus alcătuirea şi disfuncţiile reţelelor vor fi diferite la persoane diferite; astfel biologia şi ***medicina sistemică*** *– ca o nouă paradigmă integrativă – facilitează tranziţia la medicina personalizată, care descrie factorii de risc, manifestările bolii precum şi tratatmentul pe baza profilurilor individuale genomic-proteomic-metabolomic-fenomic.*

28. Informaţiile despre fiecare genă sunt prezentate, într-o formă accesibilă şi actualizată, de portalurile Entrez, Ensembl, Gene Wiki (un portal în cadrul enciclopediei Wikipedia care prezintă o pagină dedicată fiecărei gene, în care se prezintă descrierea genei din bazele de date ştiinţifice: localizare, structură, funcţie, modele de expresie şi proteine codificate).
29. În prezent se cunoaşte funcţia precisă a circa jumătate din genele umane.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- **Genome 1000** – stabilirea unui catalog detaliat al variațiilor structurale ale genomului uman – inserții/deleții („*indels*"), variații ale numărului de copii („*CNV*") și polimorfismul SNPs – prin analiza genomului a cel puțin 1.000 de persoane din grupuri etnice diferite. Aceste variații vor fi utilizate în studiile de asociație pentru identificarea factorilor de vulnerabilitate/rezistență la bolile comune;
- ***Human Genome Diversity Project (HDGP); Genome Variations Project (GVP); Human Epigenom Project.***

În această etapă cea mai mare surpriză a fost numărul și varietatea **ARN necodant,** transcris de peste 85% din genomul eucromatinian, cu multiple roluri funcționale; imaginea tradițională a genomului ca „*o mașină de proteine*" s-a schimbat: genomul este „*o mașină de ARN*".

Viitorul genomicii umane – a fost definit de Francis Collins *et al.* (Nature, 2003) pe trei domenii:

- *genomică și biologie*: identificarea tuturor componentelor structurale și funcționale, reconstituirea rețelelor genetice și proteice și elucidarea rolului lor în determinismul fenotipurilor, catalogarea variațiilor ereditare ale genomului („*variom*"), identificarea mecanismelor moleculare ale evoluției prin genomică comparativă;
- *genomică și sănătate*: identificarea factorilor genomici ce determină boli, susceptibilitatea sau rezistența la boli, sensibilitatea și răspunsul la medicamente; taxonomia moleculară a bolilor, depistarea precoce a bolilor prin teste genomice; dezvoltarea unor noi medicamente; ameliorarea sănătății generale prin instrumente furnizate de genomică;
- *genomică și societate*: precizarea opțiunilor politice privind folosirea genomicii în context medical și nemedical; definirea problemelor etice a folosirii genomicii; înțelegerea relațiilor dintre genom, populații, etnii și evaluarea consecințelor acestor informații.

Deși unele detalii se vor schimba, există multe puncte clare. De aceea, în prezentarea organizării genomului uman, vom ține cont în special de *elementele certe.*

3. Structura genomului uman (după finalizarea PGU)

3.1. Date generale

PGU a finalizat în fapt secvența „*de referință*"[30] a genomului nuclear haploid, alcătuit din 24 de molecule liniare diferite de ADN ce constituie fiecare un cromozom: 22A+X+Y. În versiunea GRCh 37 (2009) acesta are o lungime totală de 3.1 Gb (eucromatina = 3200 Mb ~94% și hetrocromatina = 170 Mb ~6%) și conține (în ianuarie 2011) 21.550 gene ce codifică proteine și 8.383 gene ARN, deci un total de ~30.000 gene (evident cifra este provizorie) (tabelul 3.1)

Principalele componente din structura genomului uman (tabelul 3.2) pot fi grupate în două categorii: ADN genelor ce codifică proteine și secvențele înrudite (pseudogenele) (~1/3) și ADN extragenic (~2/3), reprezentat de: genele ARN, duplicațiile segmentare și ADN repetitiv, de diferite tipuri.

Înainte de a prezenta în detaliu datele actuale privind „*anatomia genomului uman*" vom reaminti că *secvențele codante* transcrise și translate, ce corespund exonilor genelor pentru proteine, reprezintă doar 1,1% din genom; restul sunt *secvențe necodante*, din care o mare parte sunt transcrise (de exemplu, genele ARN).

Tabelul 3.1. Reperele majore ale genomului uman

Reper	
Lungime totală (pb)	3.279.005.676
Total pb secvențiate	3.101.804.739
Gene proteine cunoscute	20.935
Gene proteine noi	615
Pseudogene	13.483
Gene ARN	8.383
Exoni gene	603.260
Transcripte genice	167.074
Variante de dimensiuni mici (SNPs, indels)	30.085.747
Variante structurale (mari)	1.118.013

(după GRCh37 și *Ensembl release* 60, ianuarie 2011)

30. „*Secvență de referință*" reprezintă ansamblul de secvențe *ADN*, codante sau necodante, identice /comune la toți indivizii speciei; deci, ea nu include diversitatea genetică și polimorfismul genetic al indivizilor speciei. Începând cu 2007-2008 au fost publicate date despre „*genomul diploid personal*" a mai multor persoane, începând cu J.D. Watson și Craig Venter.

BCU IAȘI - CELULA UNITY LIBRARY

Circa 5% din secvenţele genomului uman sunt *conservate în evoluţie* fiind reprezentate de *elementele funcţionale de bază*: genele ce codifică proteine; genele ARN necodant; regiuni de reglare a transcripţiei; alte elemente); restul genomului sunt secvenţe de *ADN* care au evoluat rapid şi divergent.

3.2. *Genele ce codifică proteine şi secvenţele înrudite*

a) Identificarea, numărul şi distribuţia genelor pentru proteine

Identificarea genelor ce codifică proteine, printre secvenţele genomice, a fost unul din obiectivele majore ale PGU. Acest proces de *„adnotarea automată"* sau de predicţie *„ab initio"* – complex, dificil şi cu imprecizii inerente – s-a bazat (în principal) pe recunoaşterea computerizată a unor elemente constitutive din structura genei (ORF, insule CpG, secvenţe UTR).

În schiţa genomului uman (2001) numărul posibil de gene era estimat la circa 31.000 (între 30.000 şi 35.000); ulterior prin finisarea acestui *„draft"* s-au corectat unele defecte de secvenţiere şi imperfecţiuni de identificare, iar în versiunea finisată (Build 35, 2004) *numărul de gene ce codifică proteine s-a redus la circa 22.500* (între 20.000 şi 25.000) (în *Ensembl release* 60, ianuarie 2011, sunt menţionate 21.550 gene proteine); acest număr nu include evident genele ARN.

> Numărul de gene pentru proteine este surprinzător de mic comparativ cu mărimea genomului şi complexitatea organismelor umane. Multe organisme inferioare au un număr apropiat de gene. Cu certitudine, complexitatea organismelor nu este determinată de numărul de gene şi se explică prin două mecanisme majore: (1) genele umane produc mai multe proteine (proteomul uman este de 10 ori „mai mare" decât numărul de gene); (2) creşterea importantă a ADN necodant, ce conţine secvenţe sofisticate de reglare complexă a expresiei genelor.

Se poate afirma că *identificarea genelor ce codifică proteine a fost în cea mai mare parte realizată*, dar nu este încă terminată; predicţia *„ab initio"* este validată prin diferite metode:

- *„adnotare funcţională manuală"* (demonstrarea experimentală că gena presupusă codifică un transcript şi/sau este translată într-o proteină), încheiată în 2006 pentru toţi cromozomii;
- *validarea experimentală* prin „producerea" unor mutaţii sau „inactivarea" genelor şi evidenţierea unui fenotip particular/anormal[31];

Tabel 3.2. Principalele componente din structura genomului uman

GENOM UMAN	ADN gene proteine şi secvenţe înrudite	Secvenţe codante	Exoni	1,1%
		Secvenţe necodante	5'UTR şi 3'UTR	
			Introni	
			Secvenţe reglatoare	
			Pseudogene	
	ADN extragenic	Secvenţe unice/număr mic copii	Gene ARN	
			Alte secvenţe transcrise, conservate	~4%
		Duplicaţii segmentare		5,5%
		ADN repetitiv	Repetiţii în tandem (cu anumite localizări cromozomiale)	
			ADN satelit	~6,3%
			ADN minisatelit şi microsatelit	~3,0%
			Repetiţii dispersate produse prin transpoziţie	45%
			LINEs	21%
			SINEs	13%
			LTR Tn	8%
			Tn ADN	3%

(după IHGSC, 2001 şi 2004; Brown, 2007; Passarge, 2007; Antonarakis, 2010; Strachan şi Read, 2010)

31. Tehnicile folosite sunt: *knock-out* – invalidarea/anularea unei gene; *knock-in* – înlocuirea unei secvenţe genice prin alta, normală sau mutantă; *knock-down* – extincţia parţială a expresiei unei gene prin ARN interferent.

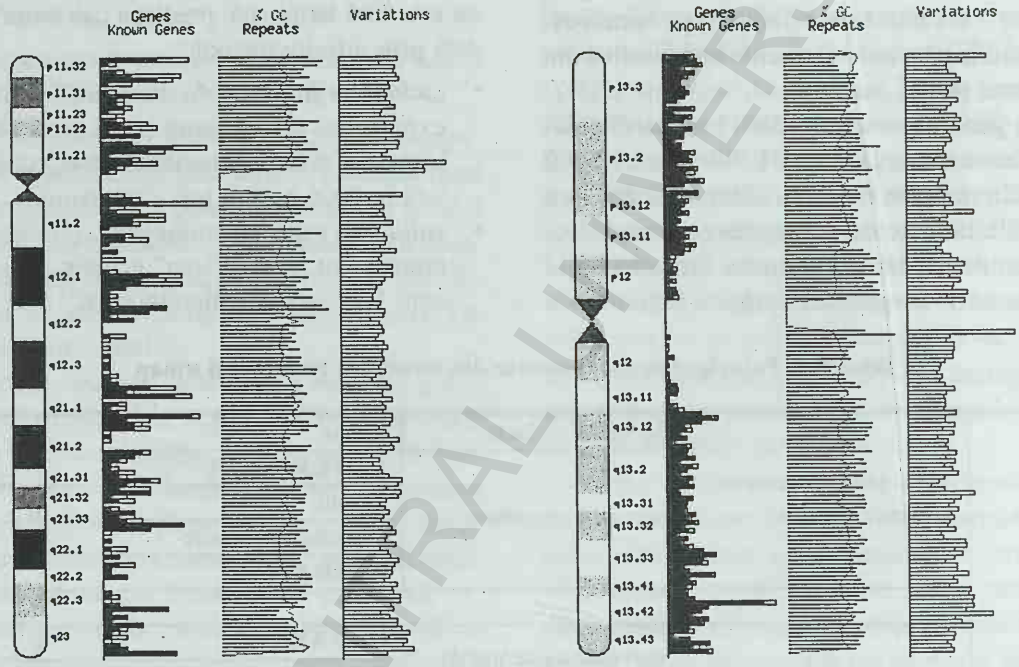
BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- *analiza comparativă a genomurilor* diferitelor specii, care evidenţiază conservarea unor gene în cursul evoluţiei.

Analiza *distribuţiei genelor în cromozomi* (densitatea medie de o genă la 120 kb) este surprinzător de *inegală* atât între cromozomi diferiţi, cât şi în acelaşi cromozom, între regiuni diferite; există cromozomi mai „săraci" în gene (de exemplu, 13, 18, X şi Y) sau mai „bogaţi" (de exemplu, 19, 22, 17); unele regiuni intracromozomiale („*urbane*") au o densitate genică mare (de exemplu, regiunile subtelomerice), spre deosebire de regiunile „*deşertice*", aproape fără gene[32], numai cu ADN necodant (astfel de regiuni se găsesc în circa 20% din genom) (figura 3.16). De remarcat faptul că benzile G negative (*deschise la culoare*) sunt mai bogate în gene comparativ cu benzile G pozitive (*închise la culoare*).

b) Structura şi funcţia genelor pentru proteine

Mărimea şi organizarea genelor pentru proteine prezintă variaţii considerabile. Unele gene sunt foarte mici, sub 10 kb (histona H4, α-interferon, insulină, β-globină), iar altele sunt foarte mari (imunoglobuline, distrofină – cea mai mare genă cunoscută, 2.400 kb); mărimea medie a genelor este de 27 Kb. Marea majoritate a genelor sunt fragmentate în *exoni* (secvenţe codante) separaţi de *introni* (secvenţe necodante). Primul şi ultimul exon conţin regiuni necodante UTR (*untranslated region*): 5'-UTR în primul exon şi 3'-UTR în ultimul exon. Numărul şi mărimea



Cromozomul 18	
Lungime (pb):	78,077,248
Gene proteine cunoscute:	285
Gene proteine noi:	7
Pseudogene:	64
Gene miRNA:	32
Gene rRNA:	13
Gene snRNA:	51
Gene snoRNA:	36
Gene alte tipuri RNA:	25
SNPs:	482,060

Cromozomul 19	
Lungime (pb):	59,128,983
Gene proteine cunoscute:	1,447
Gene proteine noi:	15
Pseudogene:	166
Gene miRNA:	110
Gene rRNA:	13
Gene snRNA:	29
Gene snoRNA:	31
Gene alte tipuri RNA:	15
SNPs:	407,913

Figura 3.16. Distribuţia genelor, %GC, repetiţiilor şi variaţiilor polimorfice în structura cromozomilor 18 (stânga) şi 19 (dreapta); principalele „elemente statistice"

(după *Ensembl release* 61, februarie 2011)

32. Unele gene care joacă un rol critic în dezvoltare şi care necesită reglări complexe sunt situate pe cromozomi în regiuni „deşertice", fără alte gene, pentru ca acţiunea lor să nu fie interferată de alte secvenţe.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

exonilor variază mult de la o genă la alta (în medie 9 exoni/genă şi 145 pb/exon; la fel de variabilă este mărimea intronilor (de la câteva zeci de kb la 300 kb; în medie 3.365 pb/intron), în ansamblul unei gene talia totală a intronilor fiind mult mai mare decât a exonilor. Există însă şi puţine *gene fără introni* (de exemplu, genele pentru histone, interferoni).

Circa 9% din genele pentru proteine sunt *gene suprapuse*, fiind transcrise de pe catenele opuse ale ADN; de asemenea multe gene ARN sunt suprapuse cu genele pentru proteine. Există şi *gene intricate* una în alta, fie pe aceiaşi catenă (exoni în introni) fie cu orientări opuse pe fiecare catenă a ADN (de exemplu, gena *NF1* are în intronul 27b, pe catena antisens, incluse trei gene mici diferite).

Secvenţele de reglare a expresiei genelor sunt mult mai complexe la om decât la organismele inferioare. Au fost identificate următoarele tipuri de secvenţe reglatoare (situate în *cis* faţă de unitatea de transcripţie: *promotor* (fixează ARN polimeraza şi declanşează transcripţia), *enhancer* (amplificator/stimulator al funcţiei), *silencer* (represor al funcţiei), *locus control region* (LCR – comutator al transcripţiei genelor în funcţie de contextul molecular), *insulators* (elemente de izolare/limitare a genelor vecine). Natura şi acţiunea secvenţelor reglatoare este încă imprecis cunoscută. Recent s-a stabilit că secvenţele de reglare se pot afla la mare distanţă de secvenţa transcrisă şi chiar în poziţie *trans*.

În contextul reglării genice semnalăm o caracteristică surprinzătoare a genomului uman: raritatea dinucleotidelor CpG. Explicaţia este că, prin metilarea şi dezaminare, citozina este înlocuită cu timină. Totuşi există circa 1% *„insule CpG"* nemetilate în regiunea promotor a 60% din genele ce codifică proteine (în special *„genele comune"*). Inactivarea insulelor CpG – prin metilare – este asociată cu represia normală (în anumite ţesuturi) sau patologică a genelor. Conţinutul în GC este mai mare în benzile G negative (colorate deschis), bogate în gene.

Datele preliminare obţinute prin proiectul ENCODE au evidenţiat un fenomen surprinzător: genele pentru proteine pot fi *transcrise divergent*, în direcţii opuse, sau co-*transcrise*, în aceiaşi direcţie, pornind de la un promotor comun şi formând transcripte multigenice care apoi sunt clivate în transcripte separate, distincte.

Genele ce codifică proteine pot fi *grupate în familii sau superfamilii* pe baza similitudinii structurale cu alte gene şi asemănării parţiale (pe domenii) a structurii proteinelor codificate; aceste familii de gene (exemplu, globină, imunoglobuline, histone, receptori olfactivi) sunt rezultatul proceselor evolutive. Membrii unei familii de gene pot fi organizaţi în „grămezi" sau grupuri, unice sau multiple, sau pot fi dispersaţi în genom.

Aşa cum am precizat anterior, exonii sunt regiunile codante ale genelor care specifică fiecare anumite domenii structurale şi funcţionale ale proteinei. Prin mecanisme complexe, o genă produce mai multe transcripte şi deci mai multe proteine (vezi capitolul 4); numărul mediu de transcripte per genă este estimat, în prezent (de ENCODE) la 5,7 transcripte/genă.

O „listă" preliminară a categoriilor funcţionale de gene cuprinde:

- 14,5% gene pentru proteine implicate în metabolismul (de exemplu, enzime – 7,5%) sau reglarea acizilor nucleici (de exemplu, factori de transcripţie – 6%);
- 14,2% gene pentru proteine ce participă la transducţia semnalului (exemplu, receptori – 5%, protein kinaze – 2,8%);
- 9,5% gene pentru proteine structurale (exemplu, citoschelet – 2,8%, matrice extracelulară – 1,2%, proteine musculare – 1,2%) sau molecule de adeziune;
- 8,2% gene pentru enzime implicate în diferite metabolisme (exemplu, hidrolaze – 4%, oxid-reductaze – 2,1%);
- 4,1% gene pentru transportori şi canale ionice;
- 2,9% – proto-oncogene;
- 0,9% gene pentru imunoglobuline;
- 4,7 % - alte tipuri de gene cu funcţie cunoscută;
- 41% din genele pentru proteine nu au încă o funcţie precis cunoscută.

c) „Naşterea şi moartea" genelor

S-a descoperit o remarcabilă *„plasticitate"* a genomului uman, demonstrată prin studiul *„naşterii şi morţii"* genelor umane. După *IHGSC (2004)*, *naşterea genelor* se face prin duplicaţie; cele mai recente duplicaţii (produse în ultimii 3-4 milioane de ani) interesează circa 1.200 gene, majoritatea fiind în genele receptorilor olfactivi, genele corelate cu imunitatea sau reproducerea. *Moartea genelor* se produce prin mutaţii, care transformă genele în pseudogene non-procesate, nefuncţionale; s-au identificat 37 de gene care „au murit" recent prin mutaţii care le fac gene nefuncţionale.

Pseudogenele sunt secvenţe asemănătoare genelor, dar nefuncţionale (*„moarte"*) datorită unor mutaţii inactivatoare; numărul lor este estimat la circa 12.600 (*Ensembl release* 60, 2011); multe dintre ele aparţin unor familii de gene, cu elemente active şi inactive. Pseudogenele rezultă cel mai adesea prin duplicaţia (completă/parţială) a unei gene, au exoni şi introni, dar evoluţia lor divergentă faţă de gena „mamă" şi acumulare de mutaţii duce la pierderea abilităţii de a sintetiza proteine. Mai rar, unele pseudogene (numite *„procesate"*) rezultă prin transcripţia inversă a unui ARNm şi inserarea copiei de ADNc (fără introni) în genom (folosind probabil maşinăria retrotransposonilor LINE). Studii recente în cadrul proiectului ENCODE

BUCUR CRISTIAN UMF TIMIŞOARA LIBRARY

au arătat că unele pseudogene procesate sunt transcrise activ şi ar putea fi pseudogene „reactivate" (sau *retrogene*).

3.3. ADN necodant

Circa 98% din genomul uman este reprezentat de secvenţele ADN care nu codifică proteine, fiind în majoritate sa **ADN extragenic** sau *intergenic*. O mare parte din acest *ADN necodant* nu avea funcţii biologice cunoscute şi, de aceea, a fost numit metaforic cândva ADN *„deşeu/inutil"* sau *„inert/egoist"*. Cercetări recente au arătat surprinzător că *majoritatea acestor secvenţe de ADN (circa 85%) sunt transcrise* în anumite perioade sau circumstanţe din cursul vieţii; unele au o funcţie identificată, inclusiv în reglarea sintezei proteinelor, altele au o funcţie încă nedeterminată (fiind puternic conservate în evoluţia speciilor[33]) şi altele au avut funcţii în trecut sau, pur şi simplu, nu au funcţii (se pare că transcripţia nu implică obligatoriu o funcţie).

Există *mai multe tipuri de secvenţe de ADN necodant (ADNnc)*:

- ***ADN necodant din structura genelor*** pentru proteine; această categorie cuprinde: *elementele cis-reglatoare* – situate în regiunile reglatoare 5' şi 3' ale genei (promotor, enhancer etc.) sau în regiunile 5'-UTR şi 3'-UTR ale primului şi ultimului exon; *intronii* – secvenţe genice transcrise în ARNm precursor şi îndepărtate din ARNm matur; unii introni au funcţii catalitice, ca *ribozime*, iar alţii pot conţine gene pentru microARN;
- ***pseudogenele*** – sunt secvenţe ADN înrudite cu genele cunoscute dar care şi-au pierdut funcţia, datorită unor mutaţii (*„fosile genomice"*);
- ***genele ARN necodant*** – transcrise în numeroase şi diverse molecule funcţionale de ARN necodant (ARNnc), care nu sunt translate în proteine, dar intervin în realizarea şi reglarea acestui proces sau au alte funcţii biologice importante; o parte din moleculele identificate de ARNnc au încă funcţii incomplet elucidate sau necunoscute;
- ***secvenţele repetitive*** – circa 50% din genom – intră în structura centromerelor şi telomerelor şi formează *transposonii*, un grup special de *elemente genetice mobile*.

Înainte de a descrie principalele clase de ADN necodant vom sublinia faptul că studii recente au arătat elocvent că mutaţiile/polimorfismele care se produc în această categorie de ADN (în special în genele pentru ARN necodant) pot avea un rol semnificativ în producerea, progresia şi chiar tratamentul diferitelor tipuri de boli comune (inclusiv cancerul, bolile cardiovasculare etc.) şi răspunsul imun la infecţii; acest fapt deschide o nouă şi interesantă perspectivă în etio-patogenia bolilor umane.

3.3.1. Genele ARN necodant

- *Genele ARN necodant* sunt secvenţe de ADN transcrise în diverse tipuri de molecule funcţionale de **ARN necodant (ARNnc)** care nu sunt translate în proteine. ARNnc formează 4/5 din *transcriptom* fiind reprezentat de ARN cu funcţii „clasice" în sinteza de proteine (ARNr, ARNt, ARNsn, ARNsno şi ARN-telomeraza), căruia i se adaugă alte specii „noi" de ARN, descoperite recent, unele *„scurte/mici"* (20-100 nt) (*ARNmi, ARNsi, ARNa, ARNti*) altele *„lungi/mari"* (peste 200 nt) (*ARN Ln* sau *ARN linc*) – cu funcţii reglatoare (tabelul 3.3).

Astăzi se vorbeşte de un *„transcriptom global"* de o extraordinară complexitate, ce corespunde la peste 85% din genom, deci *„o nouă lume de ARNnc uman"* ce constituie **ARNomul.**

În mod cert moleculele de ARNnc au surprins prin abundenţă şi diversitate (transcripte sens, antisens sau chiar bidirecţionale; suprapuse sau intercalate între multiple transcripte codante şi necodante; multigenice). Sinteza ARNnc de către ARNpolimeraza III este precis reglată (promotori; factori de transcripţie) într-un anumit context sau moment al dezvoltării.

Numărul exact al genelor ARN este dificil de stabilit[34], dar există opinii care consideră că ar putea fi la fel de numeroase ca şi genele ce codifică proteine; mărimea lor variază de la 18-25 nt până la 4.000 nt; sunt situate în regiunile intergenice[35], fiind însă *inegal răspândite în genom*.

O mare parte din tipurile de ARNnc, scurte sau lungi, prezintă *o conservare evolutivă semnificativă* şi au un rol funcţional important în diverse procese celulare:

- sinteza de proteine (ARNr; ARNt; ARNsrp),
- modificări post-transcripţionale (ARNsn – în matisare; ARNsno – procesarea ARNr şi ARNt),
- replicarea ADN (ARNtel),

33. Spre exemplu în genomul omului şi şorecelui (care au evoluat divergent dintr-un strămoş comun acum 65-75 milioane de ani) genele ce codifică proteine reprezintă doar 20% din ADN conservat (~5% din genom), restul fiind reprezentat de o parte din ADN intergenic.
34. Au fost identificate circa 3.000 de gene ARNnc „clasice" (50 de gene ARNr pe fiecare braţ al cromozomilor acrocentrici, exceptând Y; 497 gene pentru ARNt; peste 100 gene pentru ARNsn) la care se adaugă un număr nedeterminat de gene ARN „noi" (de exemplu, ~ 4.500 ARNlinc; peste 3.000 ARNlnc).
35. Unele molecule de ARNnc pot deriva din intronii ARNm precursor.

- reglare genică: fie prin fenomenul de „interferenţă" (ARNmi, ARNsi, ARNa), fie prin fenomene epigenetice, de modificare a conformaţiei cromatinei (ARNlnc),
- structura/integritate şi funcţia/dinamica cromozomilor: sinapsa meiotică, segregarea, biologia telomerelor (ARNtel, inactivarea unui cromozom X (Xist şi Tsix), reglarea ciclului celular şi proliferarea, diferenţierea celulară şi pluripotenţa celulelor stem embrionare (ARNlinc şi ARNlnc – vezi caseta 3.7).

Repertoriul funcţional vast al ARNnc, scurt sau lung, şi mai ales rolul lor decisiv în reglarea genelor pentru proteine – va permite înţelegerea evoluţiei, dezvoltării, producerii unor caractere complexe, fiziologiei normale şi etiologiei bolilor. Cert este că ARNnc constituie deja „o lume nouă" („*o reţea ascunsă*") încă neexplorată de variabilitate genetică între şi în interiorul speciilor; ultimii ani au produs o revoluţie în înţelegerea funcţiilor şi importanţei ARN.

Tabelul 3.3. Principalele grupe şi tipuri de ARN necodant identificate la om

Tip ARN nc	Abreviere	Funcţie	Acţiuni
ARNnc implicat în sinteza de proteine			
ARN ribozomal	**ARNr**	translaţie	**ARNr** (4 tipuri; 120-500 nt) formează, împreună cu anumite proteine, ribozomii; catalizează translaţia unei secvenţe a ARNm în polipeptide
ARN de trasnfer	**ARNt**	translaţie	**ARNt** (70-80 nt) transferă un anumit aminoacid la codonul specific mARN şi îl ataşează la catena polipeptidică în formare
ARN din particulele de recunoaştere a semnalului	**ARNsrp**	integrare membranară	**ARNsrp** (80-500 nt) fixează polipeptidele în curs de sinteză şi le dirijează în diferite compartimente celulare (de exemplu, reticul endoplasmatic)
ARNnc implicat în procesarea post-transcripţională sau replicarea ADN			
ARN nuclear mic	**ARNsn**	matisare şi alte funcţii	**ARNsn** (60-360 nt) este implicat în secţionarea şi îndepărtarea intronilor din ARNm-precursor sau în reglarea factorilor de transcripţie
ARN nucleolar mic	**ARNsno**	modificarea ARN	**ARNsno** (60-300 nt) participă la biogeneza şi maturarea ARNr sau ARNt şi reglarea matisării alternative a unor gene
ARN-telomeraza	**ARNtel** (TERC)	replicare telomere	ARN cu activitate enzimatică de revers transcriptază care adaugă secvenţe specifice repetitive la ADN telomeric
ARNnc cu funţii reglatoare			
ARN iniţiator al transcripţiei	**ARNti**	reglare genică	**ARNti** (18 nt) au o poziţie specifică (la 20 nt în aval de situsul de iniţiere a transcripţiei, în marea majoritate suprapuşi peste „insulele CpG") reprezintă veritabili starteri ai transcripţiei
micro ARN	**ARNmi**	reglare genică	**ARNmi** (21-22nt) acţionează prin fenomenul de „*interferenţă ARN*" şi blochează translaţia sau produce degradarea ARNm (prin complexul RISC)
ARN interferent mic	**ARNsi**	reglare genică	**ARNsi** (20-25nt) acţionează prin fenomenul de „interferenţă ARN" la fel ca ARNmi
ARN antisens	**ARNa**	reglare genică	**ARNa** este transcris de pe catena opusă a unei gene şi interacţionează fie cu promotorul genei fie cu ARNm (se formează un ARN bicatenar, degradat enzimatic)
ARN necodant lung	**ARN lnc** sau **ARN linc**	reglare genică şi alte funcţii	ARN lnc(>200nt) este implicat în reglarea expresiei genelor (prin modificarea cromatinei), biologia telomerelor, amprentare, inactivarea cromozomului X etc.

* Au mai fost descrise şi alte tipuri „minore" de ARNnc: ARN Y; ARN vault; ARNpi; ARNsca.

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

La om, cercetări foarte recente au evidențiat variații importante între ARNnc la persoane diferite; *deși avem același set de gene reglarea lor se poate face diferit la persoane diferite*[36]. Există deja argumente că **mutațiile sau polimorfismele ARNnc** (care controlează expresia genelor pentru proteine) sunt amplu implicate în etiopatogenia anomaliilor congenitale și a diferitelor boli comune (cardiovasculare, neurodegenerative[37], cancer); efectele sunt însă mult mai subtile (fenotipuri „mai blânde" decât cele produse de mutația genelor pentru proteine) și deci mai greu de identificat. Există deja informații certe privind implicarea ARNnc în diferite boli: cancer (ARNmi; ARN linc), sindromul Prader-Willi (deleția ARNsno SNORD116), autism (duplicația ARNsn SNORD115), boala Alzheimer (ARNnc lung antisens: – BACE1-AS). Capacitatea ARNnc lung de a regla genele ce codifică proteine se poate corela cu patogenia unor boli prin *expresia anormală acestui tip de ARNnc* care va deregla funcția genelor pentru proteine pe care le reglează. Dacă se vor putea identifica modificările reglatorii produse de ARNnc care stau la baza unor boli comune atunci există premiza optimistă a reversiei lor și posibilitatea (acum teoretică) că *bolnavii vor putea fi tratați cu medicamente ce fac o anumită genă mai mult sau mai puțin activă.*

În încheiere, vom sublinia faptul că – foarte probabil – primele forme de viață apărute pe pământ s-au bazat pe ARN[38] cu funcții auto-catalitice, care ulterior au trecut „sarcina" stocării de informație la ADN, mai stabil, iar funcțiile enzimatice proteinelor, mai „abile". Multă vreme s-a crezut că ARN era un simplu intermediar („*molecule accesorii*") între ADN și proteine, dar descoperirile recente schimbă această ipoteză sugerând că *ARN a continuat să evolueze*, perfecționându-și rapid capacitățile structurale și informative/reglatoare pentru a îndeplini roluri multiple și variate, prin interacțiune cu ADN și proteinele. Argumentul final este faptul că *evoluția genomică rapidă a dus la creșterea cantității de ADN intergenic* și transcrierea lui masivă în ARN, concomitent cu creșterea complexității organismelor.

3.3.2. ADN repetitiv

ADN repetitiv este reprezentat de mai multe clase, reunite în două mari categorii:

- *repetiții (în tandem) grupate în anumite regiuni din cromozomi*; în funcție de lungimea repetiției se deosebesc: *ADN satelit* (ce formează blocuri mari de heterocromatină la nivelul centromerului, telomerelor, constricțiilor secundare), *ADN minisatelit* și *ADN microsatelit* (care formează miniblocuri dispersate în lungul cromozomilor);

  În schița inițială a genomului uman (2001) minisateliții și microsateliții au fost reuniți într-o categorie distinctă de elemente repetitive denumită *SSRs* („*Simple Sequqnce Repeats*"), ce reprezintă 3% din genom.

- *repetiții dispersate în genom* – reprezentate de: copii multiple ale unor gene și pseudogene; repetiții produse prin transpoziție; duplicațiile segmentare.

ADN repetitiv a fost considerat inițial ca „ADN deșeu", deci „neinteresant"; s-a dovedit deja (și surprizele vor continua) că acest tip de ADN, ce alcătuiește peste 55% din genomul uman, a avut și are roluri importante care, cu siguranță nu ne permit să-l considerăm „inutil" și va trebui să-i acordăm atenția necesară.

Despre unele clase de ADN repetitiv am discutat deja (vezi subcapitolul 3.C.1.3); vom detalia în continuare: *repetițiile dispersate produse prin transpoziție, duplicațiile segmentare* și alte *elemente genomice speciale ce conțin ADN repetitiv (centromerele, telomerele, brațele scurte ale cromozomilor acrocentrici; vezi capitolul 2.C.3.1).*

a) Repetițiile dispersate produse prin transpoziție

Transpoziția este fenomenul prin care o secvență de ADN – numită **transpozon** - se poate deplasa în alte poziții în genomul unei celule. Reamintim (vezi 3.B.4) că în funcție de mecanismul transpoziției, transpozonii (Tn) sunt de două feluri: *Tn de clasă I* – **retrotranspozoni,** *retropozoni* sau *retroelemente* – care se copie ei înșiși, cu ajutorul transcriptazei inverse; *Tn de clasă II* se deplasează *direct* dintr-o poziție în alta, folosind o enzimă care „taie" ADN în alt loc din genom și „lipește" Tn în această breșă.

ADN repetitiv produs prin transpoziție a determinat „*expansiunea*" *genomului* organismelor complexe (formând circa 45% din genomul uman).

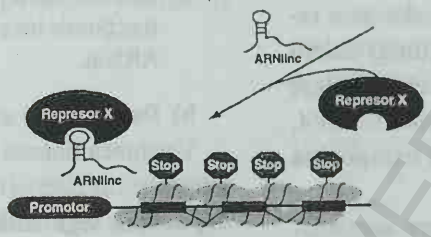
La mamifere și om, elementele transpozabile sunt de patru feluri: elemente nucleare dispersate lungi (LINEs – de la *Long interspersed nuclear elements*),

36. Recent s-a demonstrat că există diferențe majore între ADNnc la persoane diferite ce pot determina diferențe în fixarea factorilor de transcripție (proteine ce controlează activitatea genelor codante) și reglarea genelor; aceste diferențe structurale în secvențele reglatoare de ADNnc (de tipul SNPs sau CNVs) ale genomului sunt ereditare și pot influența multe caractere și riscul la dezvoltarea unor boli comune (fără ca genele proteine să sufere mutații).
37. Expresia unui „ARN toxic" se asociază cu formarea unor incluziuni și modificări degenerative în creier, mușchiul cardiac sau scheletic – producând o clasă nouă de „boli ARN-dominante" (de exemplu, distrofiile miotonice) (Osborne *et al.*, 2006).
38. O altă observație concordantă cu ipoteza că ARN a fost primul acid nucleic este că deoxiribonucleotidele sunt sintetizate în procesele celulare din ribonucleotide.

CASETA 3.7

ARNnc lung şi „zdruncinarea" dogmei centrale a geneticii

Moleculele lungi de ARNnc (>200 nt) au surprins prin abundenţă (peste 10.000) şi diversitate. Cel mai cunoscut ARNnc lung era XIST care reglează inactivarea cromozomului X la femelele de mamifere[39]*; în 2007 echipa lui John Rinn, de la Harvard University, folosind noi tehnici de analiză a transcriptomului, descoperă un alt ARNnc lung numit HOTAIR, pentru că reglează activitatea genelor homeotice HOXD, şi ulterior un întreg set (peste 4.500 molecule) de „long intergenic ncRNAs" sau* ***ARNlinc*** *– care mediază represia genelor („chromatin-dependent gene silencing") – fiind implicat în diverse procese biologice: diferenţierea celulară şi formarea ţesuturilor/organelor (pluripotenţa celulelor stem embrionare), reglarea ciclului celular şi a proliferării sau supravegherea imună. Ulterior a descoperit un alt subgrup de ARNnc – numit Long non-coding RNAs sau* ***ARNlnc*** *(peste 3.000 de tipuri până în prezent) care intensifică activitatea genelor din anumite regiuni genomice („chromatin-dependent gene activation").*



Mecanismul de acţiune al ARNlinc

A fost descifrat şi mecanismul de acţiune al moleculelor de ARNlinc: ele fixează complexele proteice (represoare[40]*/activatoare) ce modifică (modulează) cromatina şi apoi le dirijează/ghidează în anumite regiuni genomice pe care le recunosc specific; se produce remodelarea cromatinei (compactare sau relaxare, deci „o stare epigenetică specifică unui tip celular") şi represia/activarea genelor (prin blocarea sau permisia fixării factorilor de transcripţie pe anumite gene).*

ARNlinc sau ARNlnc reprezintă interfaţa dintre proteinele reglatoare şi ADN genomic din anumite regiuni; John Rinn a comparat ARNnc lung cu „controlorii traficului aerian": aşa cum ei organizează avioanele în aer, aterizarea şi decolarea lor, ARN lung determină intrarea sau ieşirea din funcţie a anumitor gene. Deci ARNnc lung are rolul central cheie în reglarea epigenetică a anumitor regiuni genomice, pe care le recunoaşte specific, şi nu proteinele represoare/activatoare (care sunt identice în celule diferite, la persoane diferite şi chiar la specii diferite). Viziunea genomului în care informaţia genetică şi programul genetic sunt centrate pe proteine pare greşită; majoritatea informaţiei genetice este încorporată în ARN necodant şi dogma centrală a geneticii „pare imperfectă". A sosit probabil timpul ca să vedem genomul uman mai mult ca o „maşină de ARN" decât ca o „maşină de proteine".

elemente nucleare dispersate scurte (SINEs – de la *Short interspersed nuclear elements*), retrotranspozoni LTR (elemente asemănătoare retrovirusurilor, care au la capete *long terminal repeats* sau LTR) şi transpozoni ADN „fosili" (asemănători cu Tn bacterieni); primele trei tipuri sunt Tn de clasă I (*retrotranspozoni*), iar tipul patru sunt Tn de clasă II.

- **LINEs** – au o lungime de circa 6 kb şi sunt numeroase (circa 850.000 copii complete sau trunchiate, ce alcătuiesc 21% din genomul uman, fiind localizate preferenţial în benzile G pozitive, bogate în AT); cel mai important element transpozabil uman este *familia LINE1* (sau *L1*) care este *autonomă*[41], activă şi în prezent, putându-se insera în diferite locuri din genom, inclusiv în genele pentru proteine, producând mutaţii şi boli umane[42]; familiile *LINE2* şi *LINE3* sunt inactive deoarece nu produc o transcriptază inversă funcţională.

Transcriptaza inversă a elementelor *L1* este extrem de veche; aceste retroelemente sunt considerate *fosile*

39. Pe cromozomul X există locusul *Xist* care produce un ARNnc lung ce determină represia unui cromozom X, prin modificări ireversibile ale cromatinei; celălalt cromozom X rămâne activ deoarece pe acelaşi locus *Xist* se produce un trasncript antisens, *Tsix*, care reprimă expresia *Xist*.
40. Circa 1/3 din moleculele de ARNlinc fixează complexul represor polycomb 2 (PRC2) ce conţine o histon-metiltransferază ce reprimă, prin metilare, expresia unor gene specifice.
41. Codifică enzimele – transcriptaza inversă şi endonucleaza – necesare propriei transpoziţiii.
42. Unele cazuri de hemofilie A şi B sau de distrofie musculară Duchenne sunt produse prin inserţia unor transpozoni în genele ce codifică proteine.

BCU "VICTOR BABEŞ" UNIVERSITY LIBRARY

moleculare ale primelor sisteme replicative ce au apărut la strămoşii procariotelor şi eucariotelor (*progenote*).

- **SINEs** – au o lungime de circa 300 pb şi se găsesc în genomul uman în circa 1,7 milioane copii (13% din genom); nu codifică transcriptază inversă şi deci sunt *neautonome*, dar se multiplică şi copiile se inseră în genom folosind enzimele produse de *LINE1*. *Familia Alu* este cea mai abundentă specie de elemente repetitive din genomul uman (circa 1.500.000 copii, una la circa 3 Kb, alcătuind 5% din genomul uman şi sunt localizate mai ales în benzile G negative, bogate în GC); a apărut acum 85 milioane de ani şi este specifică primatelor. Datorită abundenţei lor, *Alu* pot media prin recombinare omologă nealelică (ilegitimă) deleţii şi diferite rearanjări genomice[43]. Cel mai tânăr retroelement din clasa SINEs este *familia SVA*, specifică hominidelor, care realizează transpoziţia folosind „maşinăria" *LINE1*.
- **Retrotranspozoni LTR** sunt elemente asemănătoare *retrovirusurilor* (dar nu au gena de înveliş necesară pentru existenţă extracelulară). Reprezintă 8% din genomul uman; teoretic sunt capabile de transpoziţie, dar aceasta nu s-a întâmplat în ultimele milioane de ani de evoluţie.
- **Transpozoni ADN fosili** (3% din genom; familiile MER1 şi MER2) sunt asemănători virusurilor (au LTR), dar au folosit pentru transpoziţie mecanismul „*taie şi lipeşte*"; nu mai sunt activi de mult timp.

Activitatea de transpoziţie a elementelor *L1*, *Alu* şi *SVA* poate avea efecte dăunătoare asupra genomului, prin inserţie şi rearanjări. Evoluţia a generat însă căi multiple de *inhibiţie a retrotranspoziţiei*, elucidate recent: represie prin interferenţa ARN (produsă de ARNmi sau ARNsi); inactivare expresiei Tn prin metilarea ADN în celulele somatice (retroTn ar fi activi numai în celulele germinale); inhibiţie prin proteinele familiei APOBEC (cu acţiune antiretrovirală intrinsecă).

Aşa cum menţionam la început s-a demonstrat recent că ADN repetitiv derivat prin transpoziţie a avut şi are roluri importante:

- repetiţiile, ca agenţi activi, au *remodelat genomul uman*, producând rearanjări care au modificat genele existente (mutaţii) sau au creat gene noi, codante şi necodante (Tn au fost un veritabil „*rezervor de inovaţie genică*" sau „*o forţă creatoare*");
- s-au dovedit a fi *markeri paleontologici* valoroşi pentru înţelegerea evoluţiei populaţiilor umane;
- au permis înţelegerea *structurii şi dinamicii cromozomilor (elementele L1 reprezintă un mecanism ancestral de reparare a telomerelor)*;
- *SINEs* modulează expresia genelor la nivel post-translaţional (reglând matisarea alternativă, editarea ARN şi translaţia); mai mult, se apreciază că reglarea epigenetică prin metilarea ADN a derivat din mecanismele de apărare contra activităţii elementelor transpozabile;
- au foarte probabil un rol important în *dezvoltarea* organismului deoarece posibilitatea ca Tn să fie activi şi în celulele stem embrionare şi alte celule somatice determină „*un mozaicism genetic*" corelat cu dezvoltarea şi diferenţele individuale;
- cercetări foarte recente indică posibilitatea unei relaţii funcţionale între elementele repetitive *Alu* şi expresia ARNnc.

b) Duplicaţiile segmentare

Versiunea finisată a genomului uman (2004) a evidenţiat o caracteristică remarcabilă reprezentată de **duplicaţiile segmentare** („*dupliconi*") (5,5% din genomul uman). Aceste elemente repetitive netranspozabile şi în număr mic de copii („*low copy repeats*" *sau LCR*) se găsesc sub forma unor secvenţe lungi (blocuri) de 1-500 kb (majoritatea mai mari de 10 kb), în două sau mai multe copii aproape identice (≥ 90%), în una sau mai multe localizări, pe acelaşi cromozom (*duplicaţii intracromozomiale*), mai ales regiunile pericentromerice sau subtelomerice, sau pe cromozomi diferiţi (*duplicaţii intercromozomiale*).

Rolul normal al duplicaţiilor segmentare (secvenţe cvasi-identice, deci omologe) ar putea să constea în facilitarea *sinapsei cromozomilor omologi în meioză şi schimbul egal de segmente*, prin *crossing-over* (*recombinare alelică omologă*). Ele pot genera însă şi *erori de împerechere* a cromozomilor omologi, urmate de un *crossing-over* inegal (*recombinare omologă nealelică*) prin care se produc duplicaţiile/deleţiile unor segmente de ADN (figura 3.9). Această „*plasticitate a genomului uman*", consecinţa „*arhitecturii sale particulare*", generează **variaţii ale numărului de copii** de la o persoană la alta sau CNV („*copy number variation*"), constituind o formă nouă şi importantă de polimorfism[44], numită CNP („*copy number polymorphism*"), (vezi capitolul 7). Mai mult, se consideră că duplicaţiile segmentare au avut foarte probabil un rol important în crearea de noi gene la primate, precum şi o adaptare mai bună la mediu (de exemplu, populaţiile cu dietă bogată în amidon au în medie mai multe copii ale genei amilazei *AMY1*).

43. O proporţie însemnată a diferenţelor genomice dintre om şi cimpanzeu au fost produse prin recombinare ectopică mediată de repetiţii *Alu*.
44. Se apreciază că 0.4% din genomurile a două persoane neînrudite diferă prin CNV; mai mult CNVs *de novo* au fost observate la gemenii monozigoţi care ar trebui să aibă genomuri identice.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Există însă şi „*un revers*" al fenomenului: duplicaţiile segmentare predispun la remanieri genice şi cromozomiale patologice, producând – prin împerechere greşită şi *crossing-over* inegal (recombinare omologă nealelică) – deficienţa sau excesul de dozaj a unor segmente genomice (cu o structură normală); acestea sunt cauza unor **boli genomice** (sindroame cu microdeleţii/duplicaţii cromozomiale – de exemplu, sindroamele Williams, DiGeorge – sau genice, boala Charcot-Marie-Tooth). Foarte probabil consecinţele fenomenului sunt mult mai variate şi importante, polimorfismul CNV (la fel ca şi alte polimorfisme genetice) fiind asociat cu vulnerabilitatea sau rezistenţa la boli comune, complexe (*„prea puţine sau prea multe gene sensibile la dozaj*").

3.4. Actualizarea definiţiei genei

Gena a fost considerat iniţial ca o *unitate distinctă a eredităţii ce determină un anumit caracter*. Studiul cromozomilor (T.H. Morgan, 1915), descoperirea relaţiei dintre caractere şi proteine/enzime (George Beadle şi Edwards Tatum, 1941) precum şi rolului genetic al ADN (Frederick Griffith, 1928; Alfred Hersey şi Martha Chase, 1955), stabilirea structurii tridimensionale a ADN (J.D. Watson şi F.Crick, 1953) şi descoperirea codului genetic (Marshall Nirenberg, Robert Holley şi Har Khorana, 1965) au permis explicarea funcţiei ADN ca moleculă a eredităţii şi formularea dogmei centrale a geneticii în care *gena este o regiune din ADN transcrisă într-un produs funcţional specific, polipeptid sau ARN*; pe scurt, *„gena era considerată ca o unitate de transcripţie*" (figura 3.17).

Dezvoltarea tehnicilor de secvenţiere şi clonare a ADN (după 1970) au permis obţinerea unor noi informaţii privind organizarea genei (cu regiuni transcrise şi reglatoare) şi expresia genei, care (prin mecanisme multiple) poate genera mai multe produse finale funcţionale. În PGU s-a folosit definiţia genei dată de către *Human Genome Nomenclature Organization*: *„gena este un segment de ADN care contribuie la un fenotip/o funcţie*"; în esenţă, conceptul molecular de genă era „centrat pe proteine", iar numărul de gene din genomul uman – stabilit de PGU (2001; 2004) – se referă la „gene ce codifică proteine".

Secvenţierea genomului uman şi mai ales complexitatea problemelor de adnotare structurală şi funcţională a genelor (realizată recent prin proiectul **ENCODE** – ENCyclopedia Of DNA Elements – care şi-a propus identificarea şi adnotarea tuturor *elementelor funcţionale* ale genomului uman) au complicat paradoxal definiţia genei.

În esenţă, după caracterizarea completă a circa 1% din genomul uman ENCODE (2007) a evidenţiat:

- limitele fizice, *„geografice*", imprecise ale genelor, în special *dispersia mare* a elementelor reglatoare;
- suprapunerea sau intricarea unor gene diferite (ce folosesc „în comun" anumite secvenţe ADN, de pe catene opuse);
- numărul mare şi complexitatea *transcriptelor* (5,7 per genă) produse de o mare parte din genom şi generate prin mecanisme diferite, unele veritabile „surprize": *regiuni active trasncripţional (TARs)* neincluse în genele cunoscute; transcripţie bidirecţională, *sens şi antisens*, sau transcripţia *intergenică/ multigenică* (a două gene vecine); mai multe *situsuri de start al transcripţiei* (*TSSs*), unele situate la distanţă de promotor, şi folosirea lor alternativă; unele produc ARN codant altele ARN necodant; *matisarea alternativă*; *transcripţia unor elemente reglatoare* sau a unor *pseudogene*;
- abundenţa genelor ARNnc (cu funcţii diverse, inclusiv în reglarea, procesarea ARN sau sinteza de proteine), suprapuse deseori cu genele pentru proteine; numărul mare de pseudogene;
- unele proteine pot fi codificate de exoni situaţi în regiuni diferite pe acelaşi cromozom şi chiar pe cromozomi diferiţi.

Aceste rezultate impun o schimbare în concepţiile despre *organizarea genei, de la un model „liniar" la unul „modular"* în care este posibil ca un segment

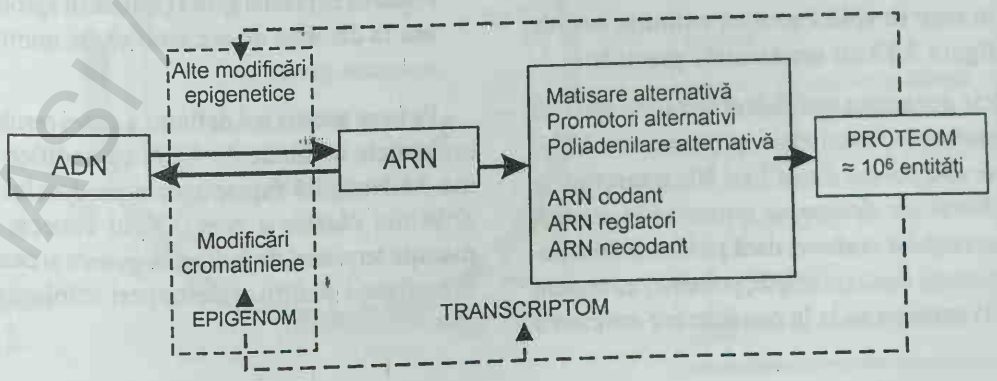


Figura 3.17. Gena ca unitate complexă de transcripţie şi reglare

(modificat după Kaplan şi Delpech, 2007)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

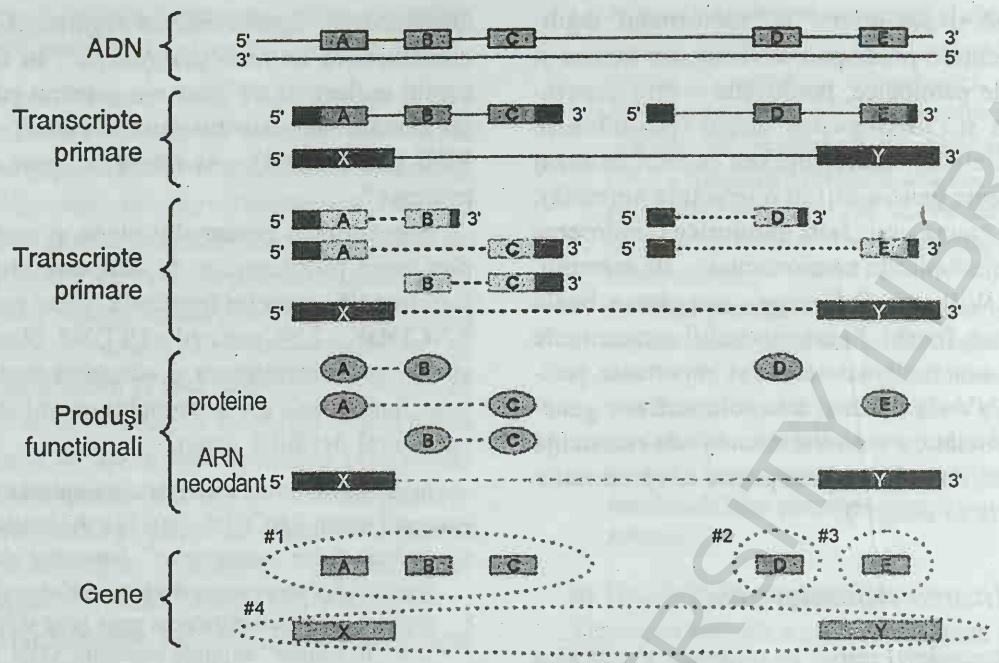


Figura 3.18. Explicaţia definiţiei actuale a genei propusă de Gerstein *et al.*, 2007

O regiune genomică ce conţine cinci *secvenţe exonice* A,B,C,D,E (dreptunghiuri) separate de introni (linii continue) produce trei *transcripte primare*: două dintre acestea conţin – în afara regiunilor 5'UTR şi 3'UTR – exonii A-B-C şi respectiv D-E şi vor codifica proteine, iar al treilea transcript codifică un ARN necodant (ARNnc): X—Y. Primul transcript primar A-B-C produce prin matisare alternativă trei *transcripte secundare*, ce conţin fiecare cel puţin doi exoni din grupul A-B-C şi vor codifica trei *proteine* A-B, A-C şi B-C. Al doilea transcript primar D-E produce două transcripte secundare ce nu au un exon comun (nu se suprapun) şi codifică proteinele D şi E. Al treilea transcript primar codifică un ARNnc, care deşi are o secvenţă comună cu exonii A şi E nu este un co-produs al acestor gene ce codifică proteine. Regiunea genomică analizată conţine deci patru gene (indicate prin ovale punctate în partea de jos): gena 1 corespunde segmentelor A, B şi C; gena 2 corespunde segmentului D; gena 3 corespunde segmentului E, iar gena 4, segmentelor X şi Y.

de ADN bicatenar să fie transcris într-o gamă de transcripte sens şi antisens, codante şi necodante. În aceste condiţii, un grup de studiu (Gerstein *et al.*, 2007) propune recent o definiţie actualizată a genei (care *ab initio* trebuie: să fie compatibilă cu datele şi nomenclaturile anterioare, să fie valabilă la toate organismele, şi mai ales să fie simplă şi practică):

> **„gena este o asociere de secvenţe genomice** *(ce pot fi)* **potenţial suprapuse care codifică** *(direct)* **un set coerent de produse** *(finale)* **funcţionale** (*proteine sau ARN*)"[45]

Modul în care se aplică această definiţie este de ilustrat în figura 3.18 cu următoarele precizări:

- secvenţele genomice *codifică direct* (una sau mai multe) molecule funcţionale, proteine sau ARN;
- *produsele funcţionale finale*[46] (şi NU transcriptele intermediare) *vor determina gruparea în aceeaşi genă a secvenţelor codante*; dacă produsele funcţionale din aceeaşi clasă (exemplu, proteine) au regiuni (domenii) comune se ia în considerare *asocierea* tuturor secvenţelor genomice (suprapuse) care le codifică;
- *această asociere trebuie să fie coerentă* – codifică separat produsele finale – dar nu impune ca toate produsele să aibă o regiune comună;
- datorită complexităţii – structurale şi funcţionale – a elementelor reglatoare precum şi a rolului important al 5' şi 3' UTR în translaţie *acestea NU vor fi considerate ca părţi ale genei* deoarece nu participă la codificarea unui produs final; autorii sugerează ca regiunile netranslate care au rol în reglarea expresiei genei (situate în apropierea genei sau la distanţă de aceasta) să fie numite „*regiuni asociate genei*".

Pe baza acestei noi definiţii a genei rezultă că *numai* secvenţele continue de ADN ce codifică o proteină sau ARNnc fără suprapunerea produselor corespund *definiţiei clasice a genei*. Noul concept repune în discuţie termenul de *boli monogenice* şi determină noi investigaţii pentru a descoperi etiologia lor reală (Speicher, 2010).

45. Cuvintele scrise în *italic* fără bold nu aparţin direct definiţiei ci precizărilor pe care autorii le fac la această definiţie.
46. Punându-se accentul pe produsele funcţionale finale, problema „*ce este o genă?*" devine „*ce este o funcţie?*"; determinarea funcţiei biologice a unui produs poate fi dificilă.

RCMI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

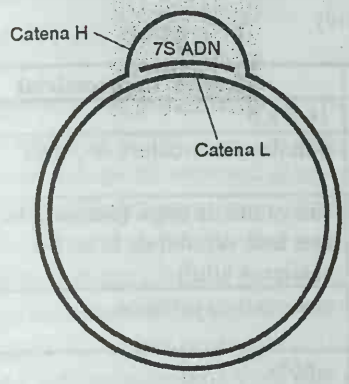


Figura 3.19. Formarea buclei D în ADN mitocondrial
(după Strachan şi Read, 2010)

4. Genomul mitocondrial

Genomul mitocondrial este definit printr-un singur tip de *ADN circular*, bicatenar (figura 3.19), format din 16.569 pb. Secvenţa sa nucleotidică a fost complet descifrată (Anderson *et al.*, 1981) şi se caracterizează printr-o mare *densitate* de secvenţe codante. Cele două catene ale ADN mitocondrial au o compoziţie bazică diferită: o catenă „grea" (**H**) este mai bogată în guanină, iar cealaltă catenă „uşoară" (**L**) în citozină. Într-o mică regiune, *bucla CR/D* (CR de la „*control region*" – deoarece aici se află situsul de iniţiere a transcripţiei şi punctele de origine a replicării; D de la „*displacement loops*"), ADN este alcătuit din trei catene, prin sinteza unei piese scurte adiţionale la catena H, numită ADN 7S (figura 3.19).

Fiecare celulă umană conţine câteva mii de copii ale **ADN mitocondrial (ADNmt)** şi de aceea cantitatea lui totală, raportată la ADN al unei celule somatice, poate reprezenta *până la 0,5-1%*. În cursul diviziunilor celulare mitotice, moleculele de ADN mitocondrial ale celulei iniţiale *segregă la întâmplare* în celulele fiice.

Trebuie subliniat faptul că genomul mitocondrial al zigotului provine aproape *exclusiv din ovul, deci de la mamă*, fapt ce determină un tip particular de *transmitere maternală* a genelor mitocondriale: de la mamă la toţi copiii săi, tatăl nu transmite ADNmt.

Genomul mitocondrial mai prezintă câteva elemente particulare, diferite de genomul nuclear: *NU este asociat cu proteine* histonice sau nehistonice şi aproape *nu conţine ADN repetitiv* (tabelul 2.1). Genomul mitocondrial este *extrem de compact*: circa 93% din ADN este format din secvenţe codante (absente doar în bucla D), ce formează **37 de gene** (28 pe catena H şi 9 pe catena L): 13 gene codifică polipeptide sintetizate de ribozomii mitocondriali (constituienţi ai sistemului de fosforilare oxidativă prin care se produce ATP), 22 gene codifică ARNt şi 2 gene ARNr (figura 3.20). Majoritatea proteinelor mitocondriale sunt codificate de gene nucleare, sintetizate în citoplasmă şi importate în mitocondrii. Genele mitocondriale sunt „strâns împachetate", aproape totdeauna *contigue*, iar unele chiar *suprapuse*; ele *nu conţin introni*.

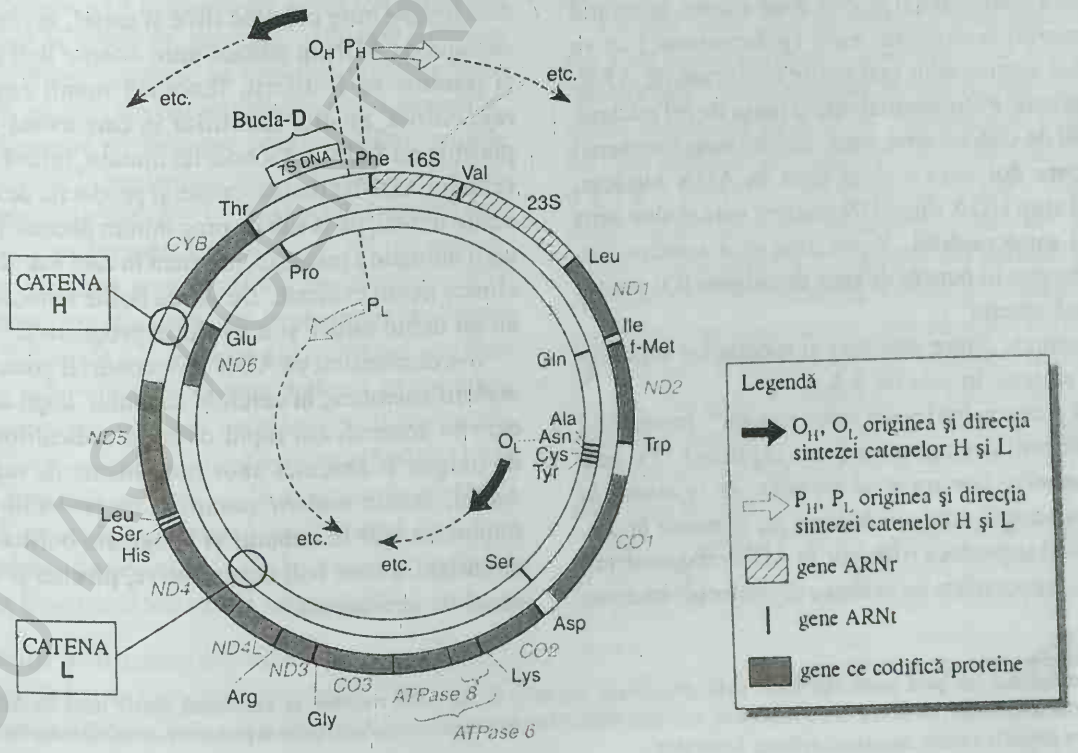


Figura 3.20. Schiţa structurii genomului mitocondrial uman
(după Strachan şi Read, 2010)

BCU IAŞI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

Tabelul 3.4. Diferențele dintre genomurile umane nuclear și mitocondrial
(modificat după Strachan și Read, 2010)

Caracteristici	Genom nuclear	Genom mitocondrial
Mărime	3.100 Mb	16,6 Kb
Număr de molecule de ADN diferite	23 (la celulele XX) sau 24 (la celulele XY)	o moleculă circulară de ADN
Număr total de molecule de ADN per celulă	23 în celulele haploide și 46 în celulele diploide	câteva mii de copii (numărul lor este însă variabil de la un tip celular la altul)
Asocierea cu proteine	mai multe clase de histone și proteine nehistonice	neasociat cu proteine
Procentul de ADN ce codifică proteine	~ 1,1%	~ 66%
Număr de gene ce codifică proteine	~ 21.000 gene	37 gene
Densitatea genelor	mică (~ 1 la 120 kb)	mare (~ 1 la 0,45 Kb)
Introni	prezenți în cele mai multe gene	absenți
ADN repetitiv	peste 50%	foarte puțin
Transcripție	de obicei individuală	transcripție multigenică, pe ambele catene
Cod genetic	61 codoni sens și 3 codoni stop	60 codoni sens și 4 codoni stop
Repararea leziunilor ADN	mecanisme multiple, eficiente	mecanisme de reparare absente; mutațiile se acumulează rapid.
Recombinare	cel puțin una pentru fiecare pereche de cromozomi omologi meiotici	absentă
Ereditate	mendeliană pentru genele de pe autozomi și cromozomul X; paternă pentru secvențele de pe Y	exclusiv maternă

Transcripția începe în promotorii (PH și PL) aflați în bucla D, este *continuă* (deci multigenică) și se desfășoară bidirecțional pe cele două catene, generând *un transcript multigenic mare* (policistronic) ce va fi ulterior secționat în mai multe molecule de ARN. Codul genetic mitocondrial *diferă* puțin de cel nuclear. El are 60 de codoni sens, patru codoni stop (nonsens) dintre care doi sunt codoni sens în ADN nuclear; codonul stop UGA din ADN nuclear este codon sens în ADN mitocondrial. *Replicarea este unidirecțională* și începe în puncte diferite de origine (O) pentru cele două catene[47].

Diferențele dintre structura și funcția lor sunt prezentate sintetic în tabelul 3.4.

ADN mitocondrial poate suferi mutații[48] producând o serie de boli degenerative (vezi capitolul 13), care sunt *transmise într-un mod specific, de la mamă la toți descendenții; bărbații bolnavi nu transmit boala.* Atunci când se produce o mutație în ADN mitocondrial, rezultă în mitocondrie un amestec de molecule mutante și normale, numit *heteroplasmie*. Când o celulă se divide ADN mitocondrial mutant va fi împărțit *la întâmplare* între celulele fiice și astfel, în timp, procentajul de ADNmt mutant între diferite linii celulare și țesuturi va fi diferit, fenomen numit *segregare replicativă.* Studiul familiilor în care există heteroplasmie cu ADN mitocondrial mutant, relevă că procentajul ADNmt mutant crește și producția de energie scade treptat, până sub un prag minim necesar funcționării normale a țesutului, moment în care manifestările clinice devin evidente. De aceea bolile mitocondriale au un debut tardiv și o evoluție progresivă.

S-a demonstrat că ADN mitocondrial poate suferi *mutații somatice*, în celulele corpului, după naștere, care se acumulează rapid datorită radicalilor liberi de oxigen și absenței unor mecanisme de reparare. Astfel, aceste *mutații somatice* au probabil un rol important atât în debutul și progresia bolilor mitocondriale, a unor boli degenerative, precum și în procesul de senescență.

47. ADN mitocondrial, prin particularitățile sale structurale, net diferite de ADN nuclear, se aseamănă foarte mult cu ADN procariotelor ancestrale; de aceea se consideră că mitocondriile își au originea din includerea unei particule asemănătoare bacteriilor de către primele celule eucariote apărute în evoluție.
48. Rata mutațiilor ADNmt este de 10-15 ori mai mare decât a ADN nuclear, fapt ce duce la acumularea unui spectru larg de secvențe polimorfice de ADNmt în populațiile umane; analizând distribuția acestor polimorfisme în populațiile umane se pot obține indicații privind evoluția lor în timp.

5. Variabilitatea structurală a genomului uman

Secvența genomului uman este identică la 99,9% dintre oameni, iar diferența de 0,1% este reprezentată de *variații individuale de secvență și structură a genomului, fără modificări fenotipice*, care atunci când se găsesc la >1% din populație sunt numite **polimorfisme**. Aceste variante normale determină *individualitate genetică* care face ca fiecare *om să aibă o secvență unică a genomului*; există probabil și diferențe semnificative între diferite populații. Cert este că variantele structurale ale genomului uman au reprezentat substratul molecular al evoluției, explicația diversității caracterelor fenotipice multifactoriale și cauza unor fenotipuri patologice sau susceptibilității/rezistenței la boli.

Fără a intra acum în detalii (vezi capitolul 7) vom preciza că variațiile structurale ale genomului uman („*variom*") se pot subîmpărți în următoarele categorii:

Variații de dimensiuni mici:

(1) *Polimorfismele unui singur nucleotid (SNPs)* sunt variații de secvență (calitative) care produc într-un anumit situs două alele alternative: – CGA**C**G- și – CGA**T**G-. Au fost descoperite inițial prin digestia ADN cu endonucleaze de restricție și numite **RFLPs** de la „*restriction fragment length polymorphism*", deoarece pot anula un situs de restricție și produc fragmente cu lungimi diferite prin digestia cu endonucleaze. În prezent, prin secvențierea genomului uman s-au identificat ~18 milioane de SNPs (~1% din genom), unul la 1.000 nt, din care ~300.000 SNPs se găsesc în exonii genelor ce codifică proteine, producând în peste ½ din cazuri substituții non-sinonime.

(2) *Repetiții de secvențe scurte* (***SSRs***), numite inițial repetiții în tandem cu număr variabil (VNTRs), includ **microsateliții** (n = 1-15 nt) și **minisateliții** (n = 15-500 nt) care împreună alcătuiesc ~ 3% din genom. Cele mai frecvente sunt repetițiile dinucleotidice (GT și AT) dar există tri-, tetra- sau penta- repetiții. Pentru fiecare SSR există mai multe alele și acest polimorfism ridicat a determinat importante aplicații în cartografierea genomului, clonarea genelor și medicina legală.

(3) *Polimorfismele inserție-deleție* (**Indels**) interesează de regulă secvențe nucleotidice foarte scurte[49], ce pot fi prezente sau absente, realizând un polimorfism bialelic, foarte util în studiul evoluției genomului uman și înțelegerii structurii sale dinamice.

Variații de dimensiuni mari

(4) *Variante ale numărului de copii* („copy number variants" sau **CNV**). CNV a fost definit ca „*un segment de ADN (≥ 1 kb) care este prezent într-un număr variabil de copii în comparație cu genomul de referință*". Aceste variante cantitative pot fi *câștig al numărului de copii* (duplicații, inserții) sau *pierderi* (deleții sau genotipuri *nule*). Atunci când CNV se întâlnesc la mai mult de 1% din populație se vorbește de *polimorfism al numărului de copii* (**CNP**). Folosind hibridizarea genomică comparativă (CGH) pe microrețele ADN, studii recente estimează la peste 38.000 numărul de CNV, ceea ce reprezintă ~ 6% din genom, acestea fiind *sursa predominantă de variație genetică printre indivizii umani*[50]. CNVs se produc prin erori de recombinare sau replicare (vezi capitolul 6) și pot fi variante polimorfice *benigne* sau pot produce fenotipuri anormale, prin alterarea dozajului genic sau modificarea structurii genice. Aceste „***boli genomice***" (vezi capitolul 9) pot fi monogenice, cromozomiale sau multifactoriale. Cert este că CNVs au avut un rol important în evoluția genelor, genomului și populațiilor umane.

(5) *Polimorfismul inversiilor sau translocațiilor*. Segmente mari de ADN pot avea orientare diferită la persoane diferite sau, în cazul unor translocații, o poziție diferită; un exemplu de polimorfism frecvent este inversia unui segment de 900 kb situat pe 17q21.31. Această inversie, definită ca haplotipul H2, este prezentă în stare heterozigotă la aproximativ 20% din indivizii de origine europeană, dar practic absentă în alte populații. Haplotipul H2 predispune la recombinare omoloagă nealelică și la apariția sindromului microdelețional 17q21.31.

La cele cinci clase de polimorfisme descrise mai sus s-au adăugat recent *polimorfismele micro ARN* (**RNAPmi**) – ce interesează genele ce codifică moleculele reglatoare de ARNmi (influențând biogeneza lor) sau situsurile de fixarea ale ARNmi (din regiunea 3'UTR a genei) și *polimorfismele ARN necodant lung* – care afectează numeroase gene de ARNnc. Există deja argumente că mutațiile sau **polimorfismele ARNnc** (care controlează expresia genelor pentru proteine) sunt implicate în etiopatogenia anomaliilor congenitale și diferitelor boli comune (cardiovasculare, neurodegenerative, cancer); efectele sunt însă mult mai subtile (fenotipuri „mai blânde" decât cele produse de mutația genelor pentru proteine) și deci mai greu de identificat.

Identificarea *diferențelor genetice* dintre persoane și corelarea variațiilor specifice sau combinațiilor lor cu riscul diferit la boli comune (vezi capitolul 14) sau cu eficacitatea unor tratamente (farmacogenomică) reprezintă bazele genomice ale **medicinii personalizate** (vezi capitolul 9).

49. *Indels* pot interesa și un singur nucleotid.
50. Se apreciază că fiecare persoană are 10-12 variante mari de tipul CNV.

BCU CLUJ LIBRARY

Importanța teoretică și practică deosebită a polimorfismelor structurale ale ADN au generat, firesc, ample proiecte de cercetare în acest domeniu deosebit de promițător pentru medicina clinică actuală sau medicina genomică dintre care putem menționa: *International HapMap Project, Genome 1000, Human Genome Diversity Project (HDGP)* și *Genome Variations Project (GVP)*.

Bibliografie specifică selectivă

1. ***. *The International Human Sequencing Consortium. The human genome: Sequencing and initial analysis*. Nature 2001; 409:860-921.
2. ***. *The International Human Sequencing Consortium. Finishing the eucromatic sequence of the human genome*. Nature 2004; 431:931-945.
3. *** WHO. *Genomics and World Health. Report of the Advisory Committee on Health Research*. WHO Geneva 2002.
4. Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mattick JS. *The eukaryotic genome as an RNA machine*. Science 2008; 319:1787--1789.
5. Antonarakis SE. *Human Genome sequence and variation*. În Speicher MR, Antonarakis SE, Motulsky AG (ed.). *Vogel and Motlsky's – Human Genetics*. ed. a IV-a. Springer, 2010, 31-53.
6. Biémont C. *Genetics: Junk DNA as an evolutionary force*. Nature 2006; 443:521. doi:10.1038/443521a
7. Cobb J, Büsst C, Petrou S, Harrap S, Ellis J. *Searching for functional genetic variants in non-coding DNA*. Clin Exp Pharmacol Physiol 2008; 35:372–375.
8. Collins FS *et al. A vision for the future of genomic research*. Nature 2003; 422:835-847.
9. *ENCODE Project Consortium*. Science 2004; 306:636-640.
10. Gerstein MB *et al. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition*. Genome Res 2007; 17:669-681.
11. Gill P. *DNA as evidence – the technology of identification*. N Engl J Med 2010; 352:669-671.
12. Gutman M *et al. Chromatin signature reveals over thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals*. Nature 2009; 458:223-227.
13. Kasowski M *et al. Variation in Transcription Factor Binding among Humans*. Science 2010: 328:232 – 235.
14. Kazazian HH, Moran JV. *The impact of L1 retrotransposons on the human genome*. Nature gen 1998; 19:19-23.
15. Khalil AM *et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression*. PNAS 2009; 106:11667-11672.
16. Li M, Marin-Muller C *et al. MicroRNAs: control and loss of control in human physiology and disease*. World J Surg 2009; 33:667-684.
17. Lifton RP. *Individual genome son the horizon*. N Engl J Med 2010; 362:1235-1236.
18. Majevski J, Ott J. *Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome*. Genome Res 2002; 12:1827-1836.
19. Mattick SJ, Makunin IV. *Non-coding RNA*. Hum Mol Genetics 2006; 15:R17-29.
20. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. *Long non-coding RNAs: insights into functions*. Nature Review 2009; 10:155-159.
21. Mishra PJ, Bertino J. *MicroRNA polymorhism: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine*. Pharmacogenomics 2009; 10:399-416.
22. Muotri AR *et al. The necessary junk: new functions for transposable elements*. Hum Mol Genetics 2007; 16:R159-167.
23. Ogawa Y, Sun BK, Lee TJ. *Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways*. Science 2008; 320:1336-1341.
24. Osborne RJ, Thoronton CA. *RNA-dominant diseases*. Hum Mol Genetics 2006; 15:R162-169.
25. Pearson H. *Genetics: what is a gene?* Nature 2006; 441:398–401.
26. Pennisi E. *DNA Study Forces Rethink of What It Means to Be a Gene*. Science 2007; 316:1556-1557.
27. Pollack JR, Iyer VR. *Characterizing the physical genome*. Nat Genet 2002; 32 Suppl:515-521.
28. Rinn JL *et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domain in human HOX loci by noncoding RNAs*. Cell 2007; 129:1311-1323.
29. Scherer WS *et al. Challenges and standards in integrating surveys of structural Variation*. Nature genetic 2007; 39:S7-15.
30. Speicher MR. From *Genes to Genomics to Proteomics*. În Speicher MR, Antonarakis SE, Motulsky AG (ed.). *Vogel and Motlsky's – Human Genetics*. ed. a IV-a. Springer, 2010, 139-163.
31. Visel A, Rubin EM, Pennacchio LA. *Genomic views of distant-acting enhancers*. Nature 2009; 461:199-205.
32. Zhang F *et al. Copy number variation in human health, disease and evolution*. Annual Rev Genomics Hum Genet 2009; 10:451-481.
33. Wutz A, Gribnau J. *X inactivation Explained*. Current Op Genet Develop 2007; 17:387-393.

BCU CLUJ - CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

Capitolul 4

EXPRESIA INFORMAȚIEI EREDITARE (FUNCȚIA GENEI)

Gregor Mendel (1865) a fost primul care a intuit existența unor „*factori ereditari*" (numiți mai târziu gene) ce determină formarea caracterelor fenotipice ereditare. Aforismul „*o genă → un caracter*" a dominat genetica clasică până când s-a stabilit că genele sunt alcătuite din ADN, iar substratul molecular al oricărui caracter este o proteină structurală sau o enzimă. Conceptul clasic „o genă → un caracter" a devenit „*o genă (ADN) → o proteină (polipeptid)*", postulând că informația ereditară conținută în ADN se exprimă prin sinteza unor proteine specifice, care stau la baza caracterelor. Ulterior s-a stabilit că gena determină un produs final funcțional, ARN sau polipeptid, iar relația nu este totdeauna așa de simplă deoarece există excepții: „o genă → mai multe polipeptide" sau „mai multe gene → o proteină". În prezent, gena este considerată o unitate de informație (de transcripție) fiind definită ca „*un segment de ADN care contribuie la realizarea unui fenotip sau a unei funcții*"; în acest context *expresia genei* reprezintă tocmai *funcția genei*. Acest proces este *precis coordonat și reglat* în raport cu programul dezvoltării ontogenetice a organismului sau cu necesitățile sale în anumite condiții metabolice, impuse de mediu.

A. Concepția clasică despre funcția genei

1. Gena – unitate de funcție și mutație

Relația „*o genă → un caracter*" este axioma fundamentală a geneticii clasice. Această „dogmă" poate fi demonstrată prin studiul mutațiilor: modificarea genei va produce o modificare ereditară a caracterului determinat de genă. Exemplele sunt numeroase și cunoscute. Să reamintim că pe cromozomul X există o genă (*GPR143*) care determină prezența pigmentului melanic în iris și retină; mutația ei are drept consecință absența melaninei și *albinismul ocular*.

Oricât ar părea de paradoxal la prima vedere, *mutația „dezvoltă" existența unei gene* normale și dă informații privind modul ei de acțiune și de transmitere. Geneticianul depindea de apariția mutației și fenotipului anormal pentru „a învăța" cum se produce și se transmite un caracter normal. De aceea, *numele unei gene* a fost stabilit inițial prin denumirea scurtă și specifică (în limba engleză) a fenotipului clinic mutant, iar *simbolul genei* printr-o abreviere/acronim de 2-3 litere a numelui genei/proteinei (scrisă cu litere latine, majuscule și italic) ± numerale arabe; de exemplu; *ACH* – pentru „*achondroplasia*"; *FH* – pentru „*familial hypercolesterolemia*"; *PKD1* – pentru „*polycystic kidney disease type 1*". Ulterior, când produsul genei/funcția a fost identificat(ă), numele genei a fost schimbat cu numele proteinei, păstrând între paranteze numele inițial. De exemplu, după ce în acondroplazie s-a identificat produsul genei (receptorul 3 al factorului de creștere fibroblastică) – numele genei a devenit „*fibroblastic growth factor receptor 3 (achondroplasia)*", iar simbolul ei *FGFR3*.

Menționăm că în timp s-au folosit diferite sisteme pentru denumirea și scrierea simbolului genelor, normale („de tip sălbatic") sau mutante, dominante sau recesive etc. În 1979 au fost stabilite primele reguli pentru denumirea genelor (Edinburgh Human Genome Meeting – „*Guidelines for human gene names and symbols*"). După înființarea HUGO și declanșarea PGU a fost înființat un comitet *ad hoc* (*HUGO Gene Nomenclature Committee)* care a publicat în 2002 o versiune nouă a regulilor de numire a genelor („*Guidelines for Human Gene Nomenclature*"), reguli actualizate aproape anual)[1].

1. Informații și pe www.genenames.org.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se poate concluziona că, în toate studiile de genetică clasică, se pleca de la caracter la genă, iar *gena era considerată unitatea de funcție și de mutație.* Relația „o genă → un caracter", care reflectă în esență relația „genotip → fenotip" (vezi capitolul 1.B.3), este însă mult mai complexă.

- Alături de caracterele „monofactoriale", monogenice (produse de o singură pereche de gene alele) sau mendeliene (transmise ereditar după legile lui Mendel), există numeroase *caractere poligenice* sau „*multifactoriale*", determinate prin acțiunea mai multor gene nealele și influențate de factori de mediu; de obicei, caracterele monogenice sunt caractere *calitative*, dihotomice: prezent sau absent, iar cele poligenice/multifactoriale sunt *cantitative* și au o distribuție normală (Gaussiană) în populație.
- În unele cazuri, o genă poate avea *efecte multiple* și poate determina mai multe caractere, acest fenomen numindu-se *pleiotropie*, iar în alte cazuri, două sau mai multe gene participă la realizarea unui caracter.
- Există numeroase *interacțiuni alelice, nonalelice și cu mediul* care influențează efectul genei, momentul sau tipul celular în care se exprimă o genă.
- Mutații ale unor gene diferite se pot manifesta fenotipic identic sau asemănător; acest fenomen se numește *heterogenitate genetică.*

2. Poligenia

Anumite caractere fenotipice complexe (normale sau anormale) sunt produse prin acțiunea a două sau mai multor gene nealele (situate în loci diferiți) care *au efecte cantitative, mici și aditive* (cumulative) (fig. 4.1.b). Acest fenomen se numește **poligenie**. În acest caz, „abaterea" de la regula „o genă → un caracter" este aparentă, deoarece fiecare genă determină „o parte" din caracter. Numărul de gene, sau mai precis de alele, care participă la realizarea caracterului este necunoscut; el variază la persoane diferite și, de aceea, *distribuția caracterului respectiv în populație va corespunde unei curbe normale, de tip gaussian* (*distribuție continuă*). În figura 4.1 (a și b) sunt prezentate două caractere normale – talia și tensiunea arterială sistolică – ce prezintă, într-o populație neselecționată, o distribuție continuă.

Trebuie să subliniem trei caracteristici esențiale ale poligeniei:

- genele care produc caracterul *acționează independent* unele de altele; între ele nu există relații de dominanță-recesivitate sau epistazie;
- expresia fenotipică a genelor poate fi frecvent *influențată de factori de mediu*; de aceea, caracterele produse prin acțiunea combinată a mai multor factori genetici și factori negenetici se numesc curent caractere cantitative sau **multifactoriale** (vezi capitolul 6.E). Acest termen este mai larg și nu trebuie echivalat cu cel de poligenie; acesta are un sens mai restrictiv și nu implică obligatoriu o componentă de mediu;
- spre deosebire de caracterele monogenice, caracterele poligenice *nu urmează modelele de transmitere mendeliene* (deși pot fi prezente la mai mulți membri dintr-o familie) și variază după un gradient continuu, având o distribuție gausssiană.

Caracterele multifactoriale normale (talia, tensiunea arterială, culoarea pielii, inteligența ș.a.) sau anormale (numeroase malformații congenitale izolate/unice, bolile comune ale adultului, inclusiv unele forme de cancere etc.) sunt frecvente și ele vor fi discutate pe larg în capitolul 14. Vom sublinia totuși aici două aspecte:

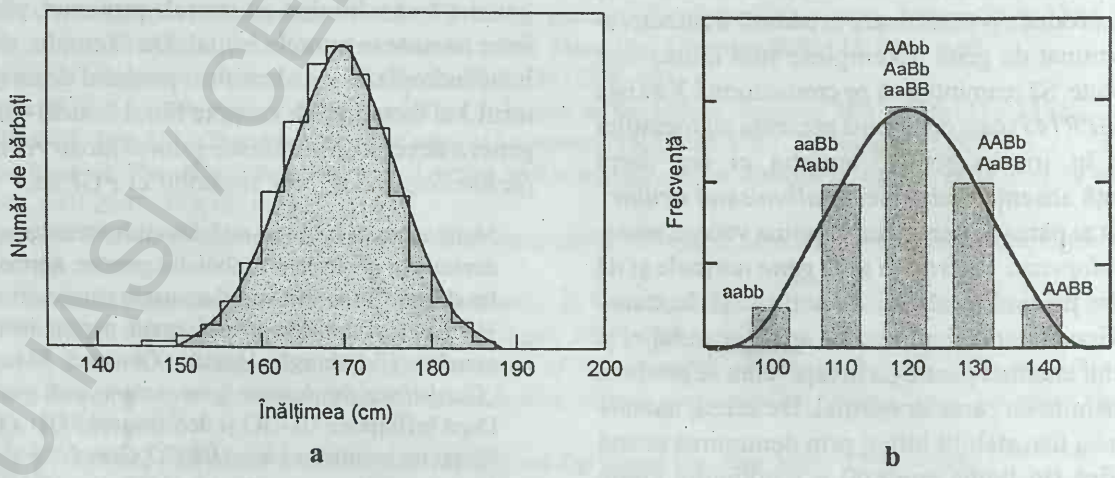


Figura 4.1. Distribuția continuă (gaussiană) a unor caractere poligenice într-o populație

a) distribuția înălțimii într-o populație de bărbați adulți (modificat după Connor și Ferguson-Smith, 1997); b) distribuția presiunii arteriale sistolice, presupunând că este determinată de doi loci (A și B), cu două alele (A și a; B și b); alelele A și B produc creșterea cu 10 mm Hg deasupra nivelului bazal de 100 mm Hg, iar alelele a și b au efect zero (modificat după Gelherter *et al.*, 1998)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- bolile multifactoriale nu au o distribuție continuă în populație; factorii genetici (reprezentați de alele mai multor gene ce realizează o distribuție continuă a genotipurilor) determină numai o *predispoziție la boală*, iar boala apare când se depășește un anumit „prag" (spre exemplu, un număr de alele de predispoziție);
- în cazul multor caractere multifactoriale, componenta genetică este deseori reprezentată totuși de un număr mic de gene, *oligogenie*, ce prezintă mai multe variante alelice în populație (unele dintre ele având efecte calitative, majore).

3. Pleiotropia

Prin **pleiotropie** (sau polifenie) se înțelege fenomenul în care o singură alelă (dominantă) sau o pereche de alele (recesive) produc efecte fenotipice multiple și diverse, în mai multe sisteme de organe și funcții. Explicația acestui fenomen este că gena codifică un produs care fie că este folosit de celule variate, fie că are o funcție de semnalizare asupra unor „ținte" diferite.

În genetica clinică se întâlnesc numeroase boli sau sindroame[2], determinate monogenic, care au manifestări clinice multiple și variate, în organe diferite. Un exemplu reprezentativ îl reprezintă **sindromul Marfan**, o boală ereditară cu transmitere autozomal dominantă și expresivitate variabilă. Acesta se caracterizează prin trei categorii de semne: *scheletice*, *oculare* și *cardiovasculare* (caseta 4.1)

Toate modificările fenotipice din sindromul Marfan sunt rezultatul unei singure mutații genice. Aparent, în acest caz există o abatere de la regula „o genă → un caracter", dar explicația efectelor

CASETA 4.1 *OMIM # 154700*

Sindromul Marfan

Definiție: *afecțiune a țesutului conjunctiv transmisă autozomal dominant, cu expresivitate variabilă, și manifestată sub formă de anomalii oculare, articulare și cardiovasculare.*

Incidență: *1/10.000 nou-născuți, fără predilecție geografică sau etnică.*

Manifestări clinice: *boala se manifestă prin anomalii în trei sisteme majore: scheletic, ocular, cardio-vascular; mai rar se întâlnesc afectări cutanate, pulmonare și durale. Anomaliile scheletice includ: talie înaltă disproporționată (pe seama membrelor), degete lungi, fine, poziționate în semiflexie (arahnodactilie), deformări ale sternului (*pectus excavatum, *mai rar* pectus carinatum*), scolioză, laxitate și hipermobilitate articulară. Anomaliile oculare sunt reprezentate de miopie sau hipermetropie, subluxație/ectopie de cristalin, cornee plată, hipoplazie iriană. Malformațiile cardiovasculare includ: dilatația aortei ascendente (cu risc de ruptură!), regurgitare aortică secundară, prolaps de valvă mitrală. Multe semne ale sindromului Marfan se dezvoltă cu vârsta.*

Patogenie: *în sindromul Marfan se produce – prin mutația genei FBN1 – o alterare a structurii țesutului conjunctiv, care explică manifestările sale clinice. Gena FBN1 codifică fibrilina 1, o glicoproteină extracelulară ce formează microfibrile în structura țesutului conjunctiv. Mutațiile FBN1 sunt foarte variate și produc boala printr-un fenomen de dominanță negativă (la heterozigoții **An**, fibrilina modificată produsă de alela **A**, inhibă formarea de microfibrile, deși alela **n** codifică o fibrilină normală). Circa 20% din cazuri sunt produse de mutații noi. Interesant de subliniat că unele mutații produc sindroame înrudite cu sindromul Marfan: arahnodactilia familială, fenotipul MASS (de la **m**itral, **a**orta, **s**keletal, **s**kin), ectopia de cristalin AD.*

Genetică: *gena FBN1 este localizată pe 15q15 și se transmite autozomal dominant. Bolnavii au risc de 50% de a avea un copil afectat cu sindrom Marfan.*

Diagnostic: *pentru afirmarea diagnosticului de sindrom Marfan este necesară îndeplinirea următoarelor condiții:*

- *cazul index: criterii majore în cel puțin două sisteme diferite și implicarea unui al treilea;*
- *membri ai familiei: prezența unui criteriu major și anamneza familială pozitivă.*

Diagnostic prenatal, screening neonatal: *posibil în cazurile cu risc, prin analiza mutației sau studii de înlănțuire. Nu se folosește pe scară largă.*

Prognostic: *rezervat datorită afectării cardiovasculare.*

Tratament: *medical (beta blocante, pentru a încetini progresia dilatației aortice; profilaxie cu antibiotice, pentru profilaxia unei endocardite) și chirurgical pentru complicațiile cardiovasculare și osteoarticulare.*

2. Prin sindrom se înțelege un ansamblu de semne/simptome care definesc o anumită entitate clinică sau un anumit mecanism patogenic.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI BIOLOGIE

multiple produse de o singură genă este (astăzi) simplă: mutația genică determină un defect în structura primară a *fibrilinei*, componentă majoră a țesutului conjunctiv. Manifestările multiple, produse prin alterarea țesutului conjunctiv în diferite teritorii, au o legătură patogenică (un mecanism comun). În acest caz, *pleiotropia este relațională.*

Pentru numeroase afecțiuni pleiotrope, conexiunea dintre diferite manifestări nu este nici evidentă și nici bine înțeleasă. În aceste cazuri, se vorbește de o *pleiotropie nerelațională*, dar acest termen exprimă de cele mai multe ori o cunoaștere incompletă a patogeniei lor. Progresul posibilităților actuale de explorare și analiză va elucida, probabil, mecanismul comun al manifestărilor multiple din sindroamele cu pleiotropie (aparent) nerelațională. Un exemplu elocvent îl reprezintă **sindromul Bardet-Biedl** (OMIM #220290). Până de curând acest sindrom era un exemplu de pleiotropie nerelațională deoarece nu se cunoștea legătura patogenică între diferitele sale semne: polidactilie, obezitate, surditate, hipogonadism, retinită pigmentară și retard mintal. Această „secvență" naturală de modificări (care apar succesiv, la vârste diferite) era considerată ca fiind produsă de mutații recesive ale unei singure gene. Între timp s-a stabilit că boala este oligogenică și poate fi produsă de mutații în 12 gene *BBS* diferite (vezi și subcapitolul 6.E.2.3) care codifică fiecare proteine ce alcătuiesc corpusculul bazal al cililor celulari (veritabili „senzori" ai modificărilor extracelulare), care activează o cale de semnalizare cu ținte diferite. Toate structurile ce prezintă astfel de cili (sau flageli) sunt afectate și astfel sindromul Bardet-Biedl devine „o boală ciliară" cu o evidentă pleiotropie relațională.

Recent s-a demonstrat că unele sindroame cu pleiotropie considerată inițial nerelațională sunt determinate de microdelеții cromozomice (vezi capitolul 10.C.3); de exemplu, **sindromul WAGR** (*Wilms tumor, Aniridia, Genital defects, Retardation syndrome*; OMIM #194072), produs de o microdelеție în regiunea 11p13 (uneori delеția interesează și 11p14 asociind obezitatea infantilă, în varianta WAGRO). Pierderea mai multor gene diferite, dar vecine, situate în aceeași regiune cromozomială, ar explica diversitatea și lipsa de corelație a manifestărilor clinice (gena *PAX6* – anomaliile oculare; gena *WT1* – tumora Wilms și anomaliile genito-urinare; gena *BDNF* – obezitate). Aceste cazuri, numite și *sindroame ale genelor contigue* (sau învecinate), ies însă din „sfera" pleiotropiei, care se referă, prin definiție, la efectele multiple ale unei singure gene.

Trebuie să subliniem faptul că, în practica medicală, sindroamele pleiotrope ridică probleme dificile de diagnostic pentru că semnele (care în ansamblul lor pun diagnosticul de sindrom) nu sunt prezente totdeauna în totalitatea lor (fie că unele nu se manifestă decât la anumite vârste, fie că pur și simplu nu apar, datorită expresivității variabile).

4. Interacțiunile genei

Expresia fenotipică a unei gene poate depinde de: interacțiunile între alelele genei (situate în același locus pe cromozomii omologi), influența altor gene, acțiunea mediului și efecte stocastice (întâmplătoare).

4.1. Interacțiunile alelice

Alelele unei gene, situate în loci omologi, pot fi identice (la *homozigoți*) sau diferite (la *heterozigoți*). În stare heterozigotă (*N/a*)[3], manifestarea alelelor depinde de relațiile „de forță" care se stabilesc între ele. Uneori se manifestă fenotipic numai una dintre alele și atunci alela și caracterul corespunzător (*N*) sunt numite **dominante**. Alela (*a*) care nu se exprimă în această situație se numește **recesivă**; ea se manifestă numai în stare homozigotă (*a/a*) sau la hemizigoți (X^aY). Alteori, la heterozigoți se manifestă fenotipic ambele alele; în această situație, alelele sunt **codominante**. De exemplu, între alelele *A1, A2, B* și *0* ale locusului grupului sangvin AB0 se stabilesc următoarele relații de dominanță și recesivitate: alelele *A1, A2* și *B* sunt dominante față de alela *0*. De aceea, genotipurile *A1/0*, *A2/0* și *B/0* vor corespunde grupelor A1, A2 și respectiv B; fenotipul 0 va fi determinat de alele recesive *o/o*; alela *A1* este dominantă față de alela *A2* și genotipul *A1/A2* va determina fenotipul A1; alele *A1, A2* și *B* sunt codominante între ele, producând fenotipul A1B sau A2B.

Este important de precizat că noțiunile de dominanță și recesivitate sunt valabile pentru caracter, deci se referă la fenotip: alelele sunt clasificate ca *dominante sau recesive pe baza expresiei lor fenotipice.* Totuși, așa cum vom vedea mai departe (capitolul 4.B.3), la nivel molecular sau biochimic nu se poate face nici o distincție între alelele „dominante" sau „recesive", deoarece, de cele mai multe ori, *ambele tipuri de alele se manifestă*, codificând o proteină.

În sfârșit, vom menționa că dominanța poate fi *completă*, atunci când fenotipul heterozigotului *A/a*

3. La scrierea concisă a unui genotip (de exemplu, A/a; AB/ab) linia ce separă simbolurile genelor ne arată că acestea sunt dispuse, separate, pe cromozomi omologi distincți; pentru simplificare, în situațiile în care ne referim *în general* la o genă dominantă (N sau A) sau recesivă (n sau a) vom folosi sistemul clasic de scriere, cu majuscule – pentru genele dominante și cu litere mici – pentru genele recesive.

BCU IAȘI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

este identic cu cel al homozigotului *A/A* (de exemplu, în sindromul Marfan), sau *incompletă* (parțială) sau *semidominanță*, când fenotipul heterozigotului *A/a* este intermediar între cel al homozigoților *A/A* și *a/a*; de aceea, în unele boli cu transmitere dominantă (de exemplu, în hipercolesterolemia familială – vezi subcapitolul 12.B.4.1), homozigoții *A/A* sunt mult mai grav afectați decât heterozigoții *A/a*.

4.2. Interacțiunile nealelice

Expresia fenotipică a unei gene nu depinde întotdeauna numai de gena însăși, fiind deseori influențată de acțiunea altei/altor gene (nealele), deci de „*fondul genetic*" al organismului, la care se poate adăuga și efectul unor factori de mediu. Aceste acțiuni determină gradul de *penetranță* și *expresivitate* al unei gene sau sunt implicate în fenomenul de *epistazie*.

a) Penetranța definește probabilitatea unei alele mutante de a se manifesta fenotipic, indiferent de intensitate. Valabilă în special pentru genele dominante în stare heterozigotă, penetranța este *o noțiune cantitativă* ce desemnează probabilitatea purtătorului alelei mutante de a prezenta un fenotip anormal. Penetranța este un parametru statistic determinat la nivelul unei populații prin identificarea procentajului de purtători ai alelei mutante cu un fenotip anormal (o penetranță de 75% semnificând deci prezența fenotipului anormal la 75% din purtătorii alelei anormale). *Aspectul cantitativ al penetranței este evident la nivelul populației*; la nivel individual penetranța are un aspect calitativ, de tipul „totul sau nimic", purtătorul alelei anormale având sau nu fenotipul anormal. Penetranța depinde de factori genetici (cum ar fi, spre exemplu, relațiile ce se stabilesc între alela mutantă și alte gene modificatoare) și de factori ne-genetici (factori de mediu sau factori stocastici). Alelele pot avea o *penetranță completă* și se manifestă ori de câte ori există în genotip sau pot avea o *penetranță incompletă*. În aceste cazuri, unele persoane posedă gena anormală, care nu se poate manifesta fenotipic („nonpenetranță"), dar se transmite la urmași, unde se exprimă mai mult sau mai puțin complet; se realizează astfel „un salt" peste o generație. (figura 4.2).

Persoana III-3 a moștenit de la mamă alela ce produce **camptodactilia** (flexia permanentă în una sau mai multe articulații interfalangiene, la unul sau mai multe degete) care nu se manifestă fenotipic; alela se transmite însă celor două fete, la care alela se exprimă. Se observă și afectarea variată a degetelor, unilaterală sau bilaterală.

Penetranța poate fi dificil de evaluat corect deoarece în multe boli monogenice debutul simptomelor se face la vârste diferite și este influențată de factori modificatori genetici sau din mediu. Asupra fenomenului de penetranță vom reveni mai pe larg ulterior (vezi capitolul 6.D.2.2.6); vom preciza însă că penetranța este un termen *clinic* ce poate fi

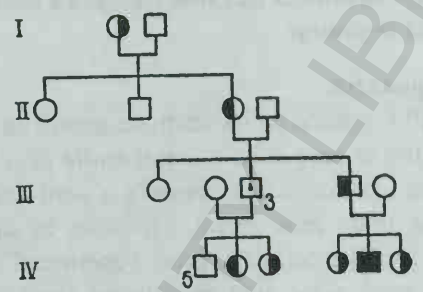


Figura 4.2. Penetranță incompletă și expresivitate variabilă într-un arbore genealogic al unei familii cu camptodactilie

Persoana III-3, deși nu manifestă anomalia, a moștenit gena mutantă de la mama sa și o va transmite celor două fete, la care gena se exprimă. Se observă și afectarea variată a degetelor, unilaterală sau bilaterală

influențat de vârstă și sex, precum și de capacitatea de explorare a fenotipului pacientului.

b) Expresivitatea reprezintă gradul (intensitatea sau severitatea) de manifestare clinică (fenotipică) a unei alele mutante și penetrante la bolnavii din aceeași familie (figura 4.2) sau din familii diferite. Expresivitatea, spre deosebire de penetranță, este o noțiune *calitativă*.

Deseori, alelele dominante cu efecte multiple (pleiotrope) se manifestă diferit la persoane cu același genotip (*A/n*). În aceste cazuri, **expresivitatea variabilă** poate interesa: spectrul semnelor (anomaliilor) manifeste, severitatea, vârsta de debut a bolii sau a unor elemente componente. La bolnavii diferiți din aceeași familie se pot întâlni forme complete de boală, forme parțiale sau fruste (oligo-/monosimptomatice). De exemplu, la bolnavii cu *sindrom Marfan* pot să nu apară toate anomaliile celor trei sisteme afectate (schelet, ochi, aparat cardiovascular) sau severitatea clinică poate să fie diferită. De menționat că expresivitatea variabilă este frecventă în bolile dominante autozomale pleiotrope, dar se poate întâlni la toate bolile ereditare, indiferent de modul de transmitere.

Cauzele expresivității variabile nu sunt, de obicei, cunoscute (vezi și capitolul 6.D.2.2.c). Se invocă *factori de mediu* ce influențează intensitatea de manifestare a bolii, interacțiunea alelei mutante cu alte gene, numite *gene modificatoare*, și, în final, mutații diferite (ca localizare și efecte) în aceeași genă („*heterogenitate alelică*").

Așa cum am precizat, penetranța și expresivitatea unor gene mutante sunt *termeni clinici*. Cunoașterea

lor are o deosebită importanţă practică deoarece pot influenţa calitatea diagnosticului şi, în funcţie de aceasta, corectitudinea sfatului genetic: neidentificarea prezenţei unei alele mutante (nonpenetranţă sau manifestare oligo- sau monosimptomatică) la o persoană purtătoare va duce la o evaluare greşită a riscului de recurenţă la urmaşi.

c) Epistazia

Un alt fenomen de interacţiune genică se referă la situaţiile în care două sau *mai multe gene interacţionează* în realizarea normală a unui caracter; dacă una dintre gene suferă o mutaţie, ea suprimă efectul celeilalte/celorlalte gene. Fenomenul în care efectele unei gene sunt modificate (pozitiv sau negativ) de una sau mai multe alte gene nealele (numite uneori *modificatoare*) se numeşte **epistazie**.

De exemplu, dezvoltarea şi funcţia normală a aparatului auditiv sunt dependente de implicarea a două perechi de gene: una (*D*) controlează formarea normală a cohleei, iar cealaltă (*E*) – dezvoltarea nervului auditiv. Mutaţiile homozigote recesive ale uneia dintre aceste gene (*d/d* sau *e/e*) produc **surditate**, chiar dacă alelele celeilalte gene sunt normale; o cohlee normală (*D/D*) nu poate funcţiona dacă nu se dezvoltă nervul acustic (*e/e*) şi invers, nedezvoltarea cohleei (*d/d*) determină surditate (de percepţie), chiar dacă nervul este integru (*E/E*). Un alt exemplu de epistazie îl reprezintă **statusul secretor**, definit prin capacitatea unor indivizi („secretori") de a elimina/secreta antigenele de grup sanguin AB0 în secreţii (salivă, lacrimi, lichid spermatic etc.). Această proprietate este determinată de o alelă dominantă, *Se*; în stare recesivă (*se/se*) nu se produc aceste antigene şi indivizii sunt „nesecretori", chiar dacă există genele *AB0*.

O dovadă indirectă a existenţei *genelor modificatoare* o reprezintă expresia mai frecventă sau exclusivă a unor caractere (determinate de gene autozomale) la un anumit sex, cum sunt, spre exemplu, calviţia frontală, guta şi keratoza palmoplantară – mai frecvente la bărbaţi – şi aplazia smalţului dentar sau căderea precoce a dinţilor – mai frecvente la femei. Există şi dovezi directe pentru existenţa genelor modificatoare: în *fibroza chistică* s-a demonstrat recent că gena *BMP* (pentru „*mannose binding protein*", o lectină cu rol important în imunitatea înnăscută) modulează frecvenţa manifestărilor şi severitatea bolii produsă de gena *CFTR*.

Epistazia poate fi realizată fie de prezenţa unei gene supresoare, fie în stare recesivă (a/a), fie în stare dominantă (A/n) şi, de aceea, există o *epistazie recesivă* în primul caz sau o *epistazie dominantă* în al doilea caz. Indiferent de tip, se pune firesc întrebarea: cum poate o genă să afecteze expresia altor gene? În exemplul de mai sus al surdităţii, rezultă evident că dezvoltarea anormală a caracterului (aparat auditiv, în acest caz) depinde de dezvoltarea/realizarea ordonată a unor părţi anatomice componente (cohlee, nerv acustic), fiecare controlată de o genă distinctă. În alte cazuri de interacţiune genică este vorba de o cale metabolică simplă sau ramificată, în care fiecare etapă este controlată de o enzimă distinctă, codificată de o anumită genă; mutaţia unei gene şi absenţa unei enzime blochează calea metabolică şi împiedică apariţia produsului final, chiar dacă celelalte gene şi enzime sunt normale. În cazul caracterului secretor, alelele genelor *Se* şi *AB0* acţionează în diferite etape ale formării antigenelor de grup sanguin într-o formă hidrosolubilă (vezi capitolul 4.B.5).

Studiul interacţiunilor genetice a devenit deosebit de actual în genomica funcţională deoarece permite identificarea unor căi sau reţele prin care mai multe gene intervin în realizarea unei funcţii.

4.3. Interacţiunile genelor cu mediul

Nu trebuie să uităm că activităţile tuturor genelor au loc în mediul celular, care la rândul lui este influenţat de factori ai mediului extern. De aceea, gradul de penetranţă şi expresivitate al multor gene depinde, într-o oarecare măsură, de factorii de mediu (fizici sau chimici). La om, expresivitatea variabilă a *polidactiliei* este, foarte probabil, condiţionată de mediu: faptul că o persoană poate avea un deget suplimentar complet la o mână şi nici unul sau numai un rudiment la cealaltă mână sau la picior pledează pentru acţiunea unui factor de mediu uterin care a interferat cu expresia genei.

Să ne reamintim că efectele nocive ale *fenilcetonuriei* (PKU) se manifestă numai atunci când se acumulează fenilalanina prin aport alimentar (vezi capitolul 1.B.2.1.c); eliminarea acestui aminoacid din alimentaţie previne retardul mental determinat de pierderea funcţiei fenilalalnin-hidroxilazei. Răspunsul variabil al diferitelor persoane la anumite medicamente (farmacogenetica) reprezintă un alt exemplu convingător al interacţiunii dintre gene şi factorii de mediu. Este deja cunoscut (vezi capitolul 1.B.2.1) efectul antimalaricelor, sulfamidelor sau al consumului de bob la persoanele cu *deficienţă în G6PD*: absenţa enzimei, de obicei nemanifestă, devine evidentă (printr-o criză de anemie hemolitică) după acţiunea acestor factori de mediu.

4.4. Efecte stocastice

Un exemplu de efect stocastic (întâmplător) este penetranţa variabilă a genelor de predispoziţie pentru diferite forme de cancer (retinoblastom, cancer de sân

etc.). Prezența unei alele mutante nu înseamnă în mod obligatoriu apariția cancerului la persoana purtătoare. Transformarea malignă fiind dependentă de inactivarea alelei normale (care este un proces aleator), boala se va manifesta doar la persoanele cu inactivare somatică a celei de a doua alele. Purtătorii la care inactivarea nu se realizează vor fi purtători sănătoși ai alelei mutante pe care însă o vor transmite la generația următoare.

5. Heterogenitatea genetică

Numeroase boli ereditare umane, indiferent de modul lor de transmitere, prezintă o **heterogenitate genetică**. Există trei tipuri de heterogenitate: heterogenitatea de locus sau nealelică, heterogenitatea alelică și heterogenitatea clinică.

a) Heterogenitatea de locus/nealelică este situația în care mutații în gene diferite, ce se află în loci diferiți, determină același fenotip clinic. Heterogenitatea de locus poate fi ușor demonstrată prin analiza arborilor genealogici ai diferitelor familii în care o boală genetică se manifestă identic.

> De exemplu, când două persoane cu **surditatea congenitală** profundă autozomal recesivă (OMIM # 220290) se căsătoresc copii lor pot avea un auz normal; această abatere de la regulile transmiterii autozomal recesive („*doi bolnavi – homozigoți – au numai copii bolnavi*") se explică prin faptul că părinții sunt surzi datorită unor mutații în gene diferite (de exemplu D și E) ce controlează aparatul auditiv. Genotipurile lor vor fi dd/EE și DD/ee, iar copii lor vor fi dublu heterozigoți – Dd/Ee – și vor auzi normal.

Analiză genealogică poate evidenția de asemenea modalități diferite de transmitere ale aceleiași afecțiuni (autozomal dominant, recesiv sau legat de X), dovedind existența unor mutații diferite în loci diferiți. Ele vor fi apoi confirmate prin studiul ADN.

> De exemplu, **retinita pigmentară** (RP) (OMIM # 268000) – o cauză frecventă de afectare și pierdere a vederii (1:3.000 – 1:5.000 persoane), datorată unei distrofii retiniene progresive ce interesează fotoreceptorii sau epiteliul pigmentar retinian, poată fi produsă de mutații diferite în cel puțin 35 de loci, mutații care se transmit ereditar diferit: autozomal dominant (23 forme; 50-60% din RP), autozomal recesiv (19 forme; 30-40% din RP), legat de X (7 forme; 5-15% din RP); există și forme legate de Y, mitocondriale sau digenice, precum și forme sindromice (8, dintre care sindromul Usher este mai frecvent).

Există multe alte exemple de heterogenitate de locus. În prezent, analiza genotipică moleculară (la nivel ADN) a demonstrat că multe afecțiuni cu un mod unic de transmitere pot fi heterogene. De exemplu, *nanismul hipofizar, osteogenesis imperfecta, rinichiul polichistic* etc. pot fi produse de mutații în loci diferiți. Evident, în aceeași familie toți bolnavii vor avea același genotip sau, mai exact, aceeași mutație.

b) Heterogenitatea alelică este reprezentată de situații în care mutații diferite în aceeași genă produc fenotipuri asemănătoare clinic, deosebite doar prin intensitatea de manifestare a bolii. Un exemplu caracteristic îl reprezintă **distrofia musculară Duchenne** și **boala Becker** – afecțiuni relativ frecvente (1:3.500 nou-născuți băieți) caracterizate prin atrofie musculară progresivă (OMIM # 310200); ele sunt determinate de mutații diferite ale aceleiași gene (locus) *DMD*, situată pe cromozomul Xp21. Deși efectele fenotipice sunt asemănătoare, boala Becker este o formă moderată de distrofie musculară. Acest fenomen este explicat prin capapcitatea unor alele mutante ale genei *DMD* de a determina sinteza unor proteine anormale ce păstrează totuși o anumită capacitate funcțională.

Există numeroase alte exemple de heterogenitate alelică: *mucoviscidoza (forme cu sau fără insuficiență pancreatică), hemofilia A, beta-talasemia, neurofibromatoza, surditatea, boala Tay-Sachs* etc. Se spune că heterogenitatea alelică este o regulă în bolile mendeliene la om. De aceea, în multe boli recesive, persoanele afectate nu au genotipuri pur homozigote; ele sunt deseori **heterozigoți compuși** deoarece au două alele mutante diferite (*a1/a2*).

În unele afecțiuni genetice (de exemplu, *mucopolizaharidozele, homocistinuria, osteogenesis imperfecta, surditatea congenitală* etc.) se întâlnesc ambele forme de heterogenitate, alelică și nonalelică (de locus). Un exemplu sugestiv îl reprezintă **sindromul Ehlers-Danlos** (SED) (vezi capitolul 12.B.3.4), o afecțiune a țesutului conjunctiv (produsă printr-un defect în structura colagenului), caracterizată prin hiperelasticitate cutanată, hiperlaxitate articulară și fragilitate tisulară crescută. SED prezintă mai multe subtipuri clinice definite și prin alte semne clinice, care le diferențiază. În familii diferite, SED se transmite diferit – autozomal dominant sau recesiv, legat de X – demonstrând o veritabilă heterogenitate de locus. Analiza clinică și moleculară relevă cel puțin 10 tipuri distincte de SED și o amplă heterogenitate alelică; există, spre exemplu, șase forme autozomal dominante, din care cel puțin o parte sunt produse de mutații diferite ale aceluiași locus (variante alelice).

c) Heterogenitatea clinică. Trebuie să menționăm că heterogenitatea alelică nu produce totdeauna fenotipuri asemănătoare. Din contra, mutații diferite ce interesează *aceeași genă* (în exoni diferiți) pot avea un aspect clinic variat, producând uneori chiar *boli*

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

diferite; acest fenomen se numeşte *heterogenitate clinică sau fenotipică*. De exemplu, mutaţii diferite în gena pentru β-globină produc sicklemia (AR), β-talasemia (AR), hemoglobina instabilă (AD) şi methemoglobinemia (AD). *Sindromul Hurler* şi *sindromul Scheie* sunt două forme diferite de mucopolizaharidoză (boală de stocaj a mucopolizaharidelor în lizozomi), deşi sunt produse de variante alelice distincte ale aceleiaşi gene (care afectează aceeaşi enzimă, alfa-L-iduronidaza). Un alt exemplu: unele mutaţii în **gena RET** (situată pe cromozomul 11q12) (ce codifică un receptor tirozinkinazic, implicat în migrarea celulelor din creasta neurală) care se însoţesc de *pierderea funcţiei* genei produc o insuficientă dezvoltare a ganglionilor colonici şi, secundar, distensia colonului, tulburări de motilitate şi constipaţie severă cronică (**boala Hirschprung**); alte mutaţii în aceeaşi genă, care se însoţesc de *câştig de funcţie*, produc trei forme de cancer ereditar ale glandelor tiroidă şi suprarenală (neoplaziile endocrine multiple **MEN2A** şi **MEN2B**, precum şi *cancer medular tiroidian*); un al treilea grup de mutaţii în gena *RET* produc ambele boli la acelaşi individ. Din exemplele de mai sus rezultă că *heterogenitatea clinică este frecventă şi importantă*; explicaţia cea mai simplă a acestui fenomen este că exoni şi, implicit, domenii distincte ale unei proteine pot îndeplini funcţii diferite, iar prin mutaţii variate în aceeaşi genă sunt afectate aceste funcţii, rezultând boli diferite.

d) Importanţa practică a fenomenului de heterogenitate genetică şi clinică

Fenomenul de heterogenitate genetică, frecvent întâlnit în genetica medicală, are o deosebită importanţă practică pentru acurateţea diagnosticului clinic şi etiologic, tratamentul diferenţiat al unei manifestări clinice produse de genotipuri diferite şi, bineînţeles, pentru realizarea unui sfat genetic corect (în funcţie de modul diferit de transmitere). Iată succint câteva exemple şi deci argumente care demonstrează importanţa practică a cunoaşterii acestui fenomen.

- *Tratamentul.* În cazul unei afecţiuni cu heterogenitate genetică (de exemplu, hemofilia A şi B; hiperfenilalaninemia), diagnosticul va fi incomplet dacă nu se precizează tipul etiopatogenic şi acest lucru poate avea consecinţe negative în tratament; aplicarea unei terapii identice unor boli genotipic diferite, dar cu aceeaşi manifestare clinică, riscă să fie deseori fără succes. De exemplu, hiperfenilalaninemia, care produce secundar debilitate mentală, poate fi cauzată de o deficienţă a enzimei fenilalaninhidroxilaza (în PKU, forma clasică de fenilcetonurie) sau de unele anomalii ale metabolismului biopterinei; PKU poate fi tratată cu succes prin restricţia dietetică a fenilalaninei în timp ce, în a doua situaţie, acelaşi tratament este ineficace.
- *Prognosticul* bolilor cu heterogenitate alelică (de exemplu, distrofie musculară Duchenne şi distrofia musculară Becker) este de asemenea diferit.
- *Sfatul genetic.* Riscul de recurenţă a retinitei pigmentare este de 50% în formele autozomal dominante, 25% în cazurile autozomal recesive şi 50% la băieţi, în formele recesive legate de X; fără precizarea modului de transmitere, deci a diagnosticului etiologic, sfatul genetic în retinita pigmentară nu poate fi corect realizat.

B. Concepţia actuală despre funcţia genei

În prezent, gena este definită ca „*un segment de ADN care contribuie la realizarea unui fenotip sau unei funcţii*", fiind o unitate de transcripţie care determină un produs final funcţional, ARN sau polipeptid. Deoarece caracterele fenotipice ale organismului au la bază o proteină (un polipeptid) în prezentarea funcţiei genei ne vom centra pe mecanismele prin care genele determină sinteza proteinelor.

1. Genele controlează sinteza proteinelor

Explicând funcţia genei prin relaţia „*o genă → un caracter*", genetica clasică nu a putut răspunde la întrebarea: „cum acţionează genele în formarea, dezvoltarea şi funcţia organismului?".

Prima formulare a unui răspuns corect aparţine unui medic englez, sir Archibald Garrod, care postulează o legătură specifică între gene şi proteine. În 1902, Garrod descrie **alcaptonuria,** o boală ereditară (OMIM # 203500) care se transmite în succesiunea generaţiilor în concordanţă cu legile lui Mendel. Bolnavii suferă de artrită, calculi renali, iar urina, transpiraţia, cerumenul lor capătă o culoare brun-închisă/neagră după expunerea la aer. Garrod a presupus că boala este determinată de un *blocaj biochimic* produs de lipsa enzimei care metabolizează acidul homogentizic (figura 4.3). Simptomatologia bolii este rezultatul *acumulării* acidului homogentizic în organism, ca urmare a *barajului* căii metabolice. Prin acelaşi mecanism el explică mecanismul altor trei boli ereditare, inclusiv *albinismul*, unde există un blocaj metabolic pe calea de transformare a tirozinei

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY

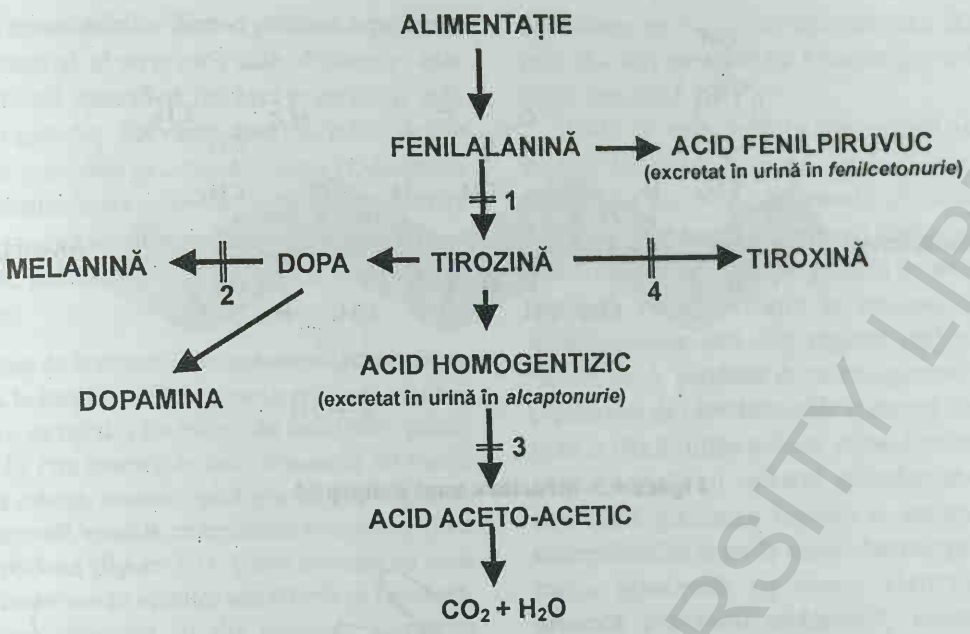


Figura 4.3. Metabolismul fenilalaninei și tirozinei cu blocurile biochimice care produc câteva „erori înăscute de metabolism"

1. fenilcetonuria; 2. albinismul; 3. alcaptonuria; 4. deficiența congenitală în tiroxină

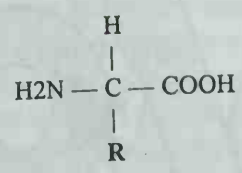
în melanină. Garrod a stabilit astfel o relație clară între gene și enzime și a introdus în medicină conceptul de **erori înnăscute de metabolism** (prefigurând era patologiei moleculare).

Din păcate, ca și în cazul lui Mendel, importanța remarcabilelor cercetări de genetică clinică ale lui Garrod n-a fost percepută nici de medici și nici de biologi. Abia peste 40 de ani, experiențele efectuate de Edward Beadle și George W. Tatum la *Neurospora crasa* au demonstrat fără echivoc relația *„o genă → o enzimă"*, aducându-le autorilor un binemeritat Premiu Nobel (1958). Numeroase alte dovezi obținute ulterior la microorganisme, plante, animale și om au demonstrat incontestabil că genele își exercită controlul asupra organismului prin influența lor asupra formării proteinelor. Prin enorma lor diversitate și complexitate structurală, ca și prin rolul lor structural, catalitic (enzime) sau reglator, proteinele determină aproape toate caracterele organismului. Relația *„o genă → o enzimă (proteină)"* a devenit în scurt timp *„o genă → un polipeptid"*, deoarece unele proteine formate din două sau mai multe polipeptide (de exemplu, hemoglobina) sunt codificate de gene distincte, care controlează fiecare sinteza unui polipeptid. Această relație nu este general valabilă deoarece unele gene codifică diferite tipuri de ARN; de aceea, *gena a fost definită ca un segment de ADN ce determină sinteza unui produs funcțional*. Genele care codifică proteine au fost numite și *gene structurale*.

2. Structura proteinelor

Întrucât proteinele reprezintă „suportul" biochimic al caracterelor noastre fenotipice, iar sinteza lor este determinată genetic, pentru a înțelege mecanismul complex al relației „o genă → o proteină" sunt utile câteva noțiuni sintetice despre structura acestor compuși organici.

Proteinele sunt alcătuite din una sau mai multe catene polipeptidice, formate prin polimerizarea a 20 de tipuri de aminoacizi. Deși diferiți în complexitatea lor, ei au la bază o structură comună de tipul:



Radicalul **R** diferă de la un aminoacid la altul și determină structura și proprietățile aminoacidului. Aminoacizii se unesc între ei prin legături peptidice (figura 4.4), formând o catenă liniară polipeptidică; aceasta are „o coloană vertebrală" (în zig-zag) alcătuită din –C–N–, pe care se fixează lateral și în mod alternativ gruparea R (figura 4.5). Numărul, tipul și secvența aminoacizilor în lanțul polipeptidic alcătuiesc *structura primară a polipeptidului (proteinei)*.

BUCHAREST MEDICAL UNIVERSITY LIBRARY

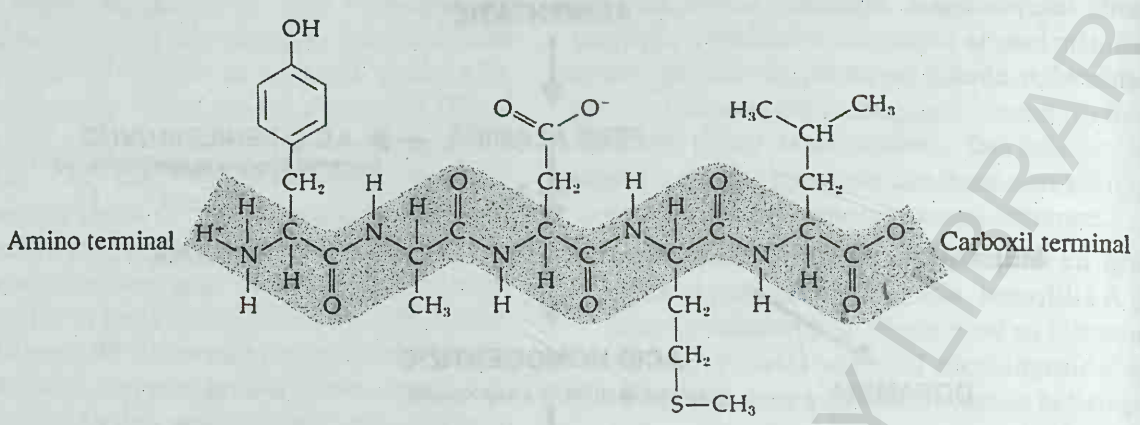


Figura 4.5. Structura unui polipeptid

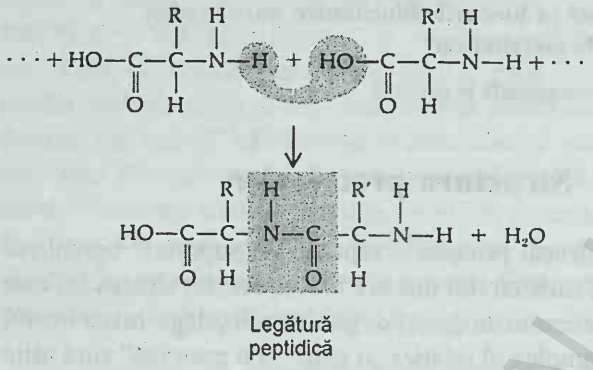


Figura 4.4. Legătura peptidică dintre doi aminoacizi

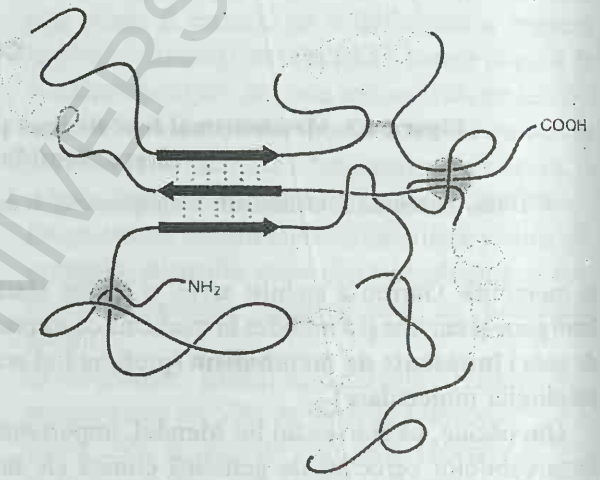
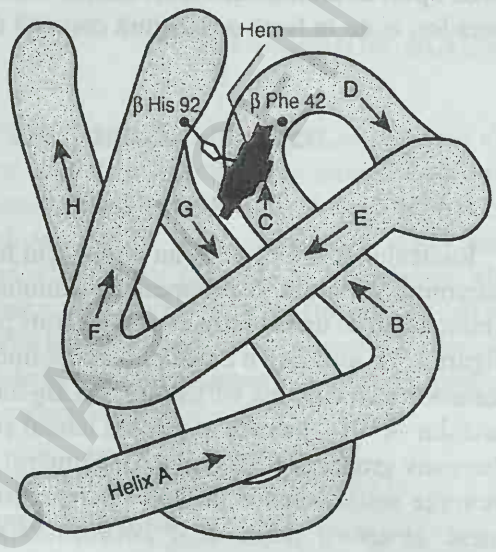
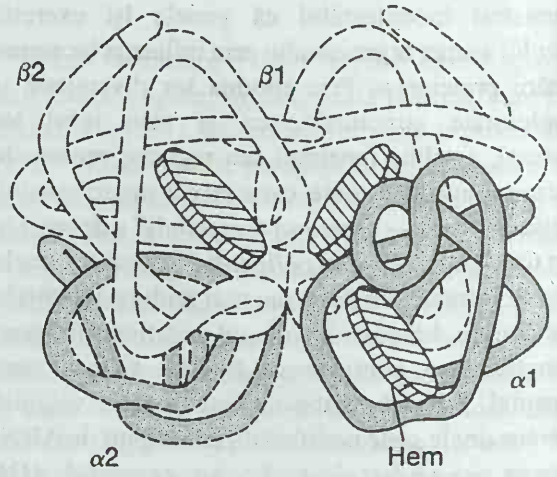


Figura 4.6. Structura secundară a unui polipeptid
(modificat după Harte *et al.*, 1988)





a b

Figura 4.7. Structura terțiară și cuaternară a hemoglobinei
(modificat după Stine, 1989, Thompson *et al.*, 1991)
a) Structura terțiară a moleculei, cu 8 regiuni helicale, notate de la A la H, și „punga" hemului; b) Structura cuaternară cu două lanțuri alfa identice (în gri) și două lanțuri beta identice (în alb)

BCU UNIVERSITY LIBRARY

Secvența aminoacizilor dintr-o proteină reprezintă elementul esențial al structurii sale, deoarece: *este unică, constantă, specifică* fiecărei proteine și este *determinată genetic*. Secvența aminoacizilor *determină funcția proteinei și antigenicitatea ei*, deoarece prin interacțiunile dintre aminoacizii situați în diferite situsuri din structura polipeptidului se realizează structurile spațiale, tridimensionale, ce determină activitatea sa biologică.

Prin legături de hidrogen între aminoacizii învecinați se formează, în anumite porțiuni/zone ale proteinei, *structuri secundare* de tip alfa (în elice) sau beta (foaie pliată) (figura 4.6). Prin interacțiuni între aminoacizi din diferite poziții ale catenei, aceasta capătă spontan o configurație tridimensională, spațială, ce reprezintă *structura terțiară* a polipeptidului (figura 4.7). Unele proteine au două sau mai multe catene identice sau diferite ce formează, singure sau împreună cu alte molecule neproteice (cofactori sau liganzi), complexe macromoleculare (*structura cuaternară*). *Configurația spațială caracteristică unei proteine determină activitatea ei funcțională.* De notat că proteinele funcționale nu sunt totdeauna sintetizate în forma lor activă. Ele suferă modificări posttranslaționale care determină „*activarea*" proteinei.

Aminoacizii care interacționează între ei pentru a forma structura tridimensională, biologic activă, sau care alcătuiesc așa-numitele „*situsuri funcționale*" ale proteinei sunt deosebit de importanți; înlocuirea lor, în urma unor mutații, duce la o *proteină anormală* (cu o structură spațială modificată) și la pierderea activității proteinei. Înlocuirea altor aminoacizi, neimplicați în legăturile spațiale sau în situsul funcțional, este mai puțin importantă și poate produce *variante proteice normale*.

3. Genele determină secvența aminoacizilor în proteină

Genele care codifică proteine conțin mesajul codificat necesar pentru asamblarea specifică (într-o anumită ordine) a aminoacizilor în proteină. Această relație a fost elegant demonstrată prin studiul mutațiilor care produc diferite tipuri de hemoglobină anormală și, în special, prin cercetarea drepanocitozei sau sicklemiei, o anemie hemolitică cu hematii în formă de seceră („*falciforme*", de la termenul latin *falx* ce înseamnă seceră).

Drepanocitoza (sicklemia) este o boală sangvină ereditară, cu transmitere autozomal recesivă, frecventă în populația originară din Africa tropicală (1:500 nou-născuți), precum și în bazinul mediteranean, Orientul Mijlociu și India. Această distribuție geografică specifică se explică prin avantajul selectiv față de malarie pe care îl au heterozigoții sănătoși (1:25 nou-născuți) protejați de formele grave de paludism (vezi capitolul 7.B).

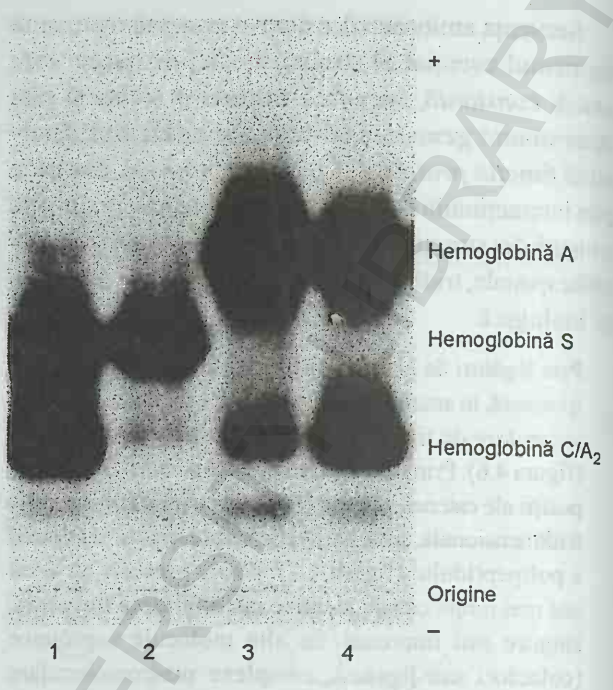
Boala se manifestă la homozigoți (*a/a*) printr-o *anemie hemolitică severă*, produsă prin distrugerea hematiilor cu *formă anormală* „în seceră" (figura 4.8.a); aceste hematii anormale formate în condițiile scăderii concentrației oxigenului în anumite teritorii capilare. Formele acute se însoțesc de dureri în mâini/picioare sau alte organe (splină, mezenter, rinichi etc.), produse de *microinfarcte* prin ocluzia capilarelor de către hematiile în seceră, care sunt rigide și au o flexibilitate redusă. *Hemoliza* se asociază cu *splenomegalie* și infarcte splenice recurente, care determină pierderea funcției ei imune și creșterea susceptibilității la unele infecții bacteriene (pulmonare), cauza principală de deces. Heterozigoții (*N/a*) prezintă *trăsătura sicklemică*; obișnuit, ei sunt sănătoși, dar scăderea brutală a concentrației O_2 (la altitudine) poate produce, prin „sicklizarea" hematiilor, o anemie hemolitică acută și infarcte splenice.

În 1949, Linus Pauling și colaboratorii săi au demonstrat existența în hematiile „în seceră" a unei hemoglobine (Hb) anormale numită HbS, care se deosebește electroforetic de HbA (normală) deoarece, datorită unei mutații genice, moleculele lor de beta-globină sunt diferite (figura 4.8.b). Cercetătorii au stabilit că la persoanele heterozigote (*N/a*) cu trăsătură sicklemică există un amestec de HbA și HbS. Ulterior (1956), Vernon Ingram a descoperit că HbS are unul din cei 146 de aminoacizi ai catenei-beta, și anume cel din poziția 6, înlocuit cu un alt aminoacid (acid glutamic → valină). Această unică schimbare a moleculei de Hb produce modificarea formei eritrocitului și toate manifestările clinice ale bolii. Pauling și Ingram au demonstrat astfel, pentru prima dată, că *mutația unei gene structurale poate produce o substituție a unui aminoacid în proteina* corespunzătoare și au postulat că drepanocitoza sau sicklemia reprezintă prototipul de **boală moleculară**.

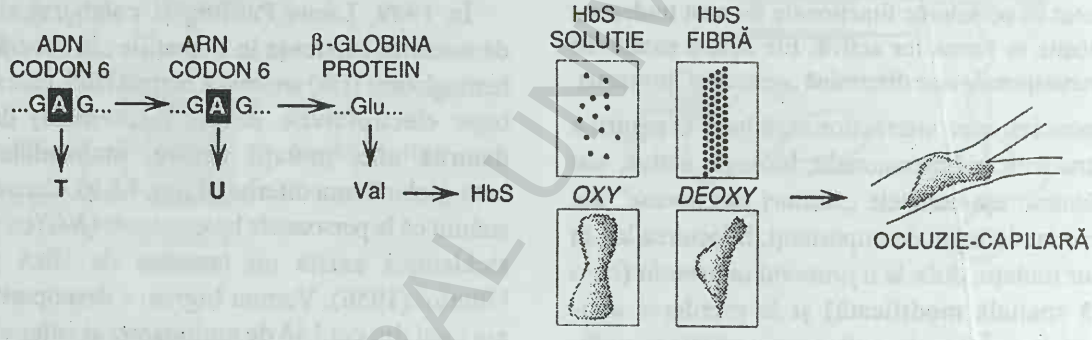
După 1975, identificarea, localizarea și secvențierea alelei normale a genei pentru beta-globină și a alelei sale mutante (β^S) au stabilit cu precizie tipul de mutație: în codonul 6 (GAG) al genei beta-globinei, adenina este înlocuită cu timina, formând codonul GTG care codifică valina. Iată deci că modificarea unui singur nucleotid din cele trei miliarde de nucleotide care alcătuiesc genomul uman este cauza modificărilor patologice observate la bolnavii cu drepanocitoză. Explicația patogenică a acestei boli moleculare este acum simplă (figura 4.8.c): moleculele de HbS conținând subunitatea beta mutantă fixează în mod normal O_2, dar în sângele dezoxigenat ele sunt relativ insolubile, comparativ cu HbA normală,

BCU CENTRAL UNIVERSITARY

a



b



c

Figura 4.8. Anemia hemolitică cu hematii în seceră (sicklemia sau drepanocitoza)

a) Frotiu sangvin cu hematii în seceră; b) electroforeza hemoglobinei A, S şi C la diferiţi bolnavi (1-4); c) patogenia moleculară a sicklemiei

această proprietate fizică stând la baza fenomenului de sicklizare. În condiţiile scăderii concentraţiei de oxigen, molecula de HbS agregă şi formează polimeri, având forma unor fibre care distorsionează eritrocitul şi-l fac mai puţin deformabil decât în mod normal; el nu mai este capabil să traverseze prin capilarele fine (cu un diametru inferior celui al hematiei), blochează fluxul sangvin şi produce hipoxie locală (microinfarcte dureroase). Eritrocitele în seceră se hemolizează (în splină) generând o anemie cronică.

Studii ulterioare au evidenţiat numeroase alte tipuri de *hemoglobinopatii ereditare*, în care schimbarea structurii Hb era rezultatul substituţiei unui singur aminoacid. De exemplu, HbC rezultă printr-o substituţie nucleotidică în acelaşi codon 6 al genei beta-globinei, care duce la înlocuirea acidului glutamic cu lizina. A devenit astfel evident şi unanim acceptat că genele determină secvenţa primară a aminoacizilor dintr-o proteină specifică.

Descrierea amplă a defectului molecular în drepanocitoză permite câteva *concluzii* importante privind concepţia actuală despre funcţia genei:

(1) Genele care codifică proteine conţin (sub forma unei secvenţe de nucleotide) informaţia genetică necesară pentru *asamblarea specifică (într-o anumită ordine) a aminoacizilor* într-o proteină specifică; mutaţiile genice produc o schimbare (substituţie) a secvenţei unui/unor codon(i) şi, secundar, o modificare a structurii proteinei, care poate genera o *boală moleculară*.

(2) În acţiunea genei se pot identifica trei categorii de efecte corelate: *efectul primar*, la nivel molecular (proteină); *efectul secundar*, la nivel celular, şi *efectele terţiare* multiple (pleiotropie), la nivel fenotipic, de organ/organism (semne şi simptome).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În practica medicală se recunosc clinic sau paraclinic efectele terțiare ale genei mutante, adică boala ereditară cu diversele sale manifestări; efectele primare (proteina anormală) nu sunt cunoscute în multe boli monogenice, dar tehnicile recente de analiză a structurii și funcției genei vor rezolva enigma acestor „pete albe".

(3) La heterozigoți (*N/a*) se manifestă (exprimă) la nivel molecular ambele alele și persoanele heterozigote cu trăsătura sicklemică (genotip A/S) produc și HbA și HbS. Rezultă că *noțiunile de dominant și recesiv NU sunt valabile la nivel molecular, ci numai la nivel fenotipic* (de organism).

(4) Expresia ambelor alele la heterozigoți permite identificarea lor, prin studiul efectelor primare și uneori secundare (la nivel celular). *Depistarea heterozigoților* sănătoși purtători de alelă mutantă are o deosebită valoare practică în prevenirea nașterii unor homozigoți bolnavi (doi părinți heterozigoți, *N/a*, au un risc de 25% de a avea un copil *a/a* homozigot, bolnav).

(5) Cunoașterea modificării nucleotidice în alela mutantă care produce o boală moleculară permite, prin metodele actuale de analiză a ADN, *diagnosticul genotipic precoce* al bolii fie prenatal, fie postnatal, în stadiile asimptomatice. Se deschid, de asemenea, perspectivele unei terapii genice, prin inserția unei gene normale pentru beta-globină în celulele unui pacient la care boala este consecința mutației acestei gene.

4. Relația „o genă → un polipeptid" este mult mai complexă

Evoluția cunoștințelor despre structura moleculară a genei, bazată pe posibilitatea analizei ei directe, a evidențiat o serie de fenomene care se abat de la relația fundamentală *„o genă (de structură) → un polipeptid"*. În esență, este vorba de situațiile în care o genă poate produce *mai multe polipeptide* asemănătoare sau diferite sau invers, *mai multe gene distincte*, situate uneori la distanță una de alta participă la sinteza unui singur polipeptid sau a unei proteine multipeptidice.

Primul fenomen, *„o genă → mai multe polipeptide"* se realizează prin mecanisme diverse ce intervin în diferite etape ale expresiei genei, cel mai frecvent la nivelul transcripției.

Studiile preliminare în proiectul ENCODE (vezi subcapitolul 3.C.3.2) au stabilit că se produc în medie 5,4 tipuri ARNm per locus; acestea se produc mai ales prin două mecanisme: folosirea alternativă a unor *promotori multipli*[4], ce vor duce la formarea unor produși de transcripție cu exoni inițiali diferiți și în final la mai multe izoforme proteice cu proprietăți diferite; *matisarea alternativă* , care produce de asemenea molecule de ARNm diferite, în care unii exoni sunt incluși sau omiși, și deci proteine diferite. Alte mecanisme adiționale, care operează numai asupra unor gene, sunt *„editarea ARN"* și *clivarea post-translațională* a unui produs „gigant" în mai multe polipeptide mici. Toate aceste mecanisme vor fi descrise ulterior, în subcapitolul 4.D.

Al doilea fenomen, *„mai multe gene → un polipeptid"*, se observă în cazul proteinelor/polipeptidelor alcătuite din regiuni diferite. De exemplu, lanțurile ușoare (L) și grele (H) ale imunoglobinelor prezintă o regiune variabilă (V) – care alcătuiește situsul de recunoaștere și fixare al antigenului – și o regiune constantă (C); ele sunt specificate de gene distincte, situate la distanță pe același cromozom. În limfocitele B, care produc anticorpi, se produce o rearanjare (recombinare somatică) a genomului (vezi capitolul 17) și o anumită genă V este asociată cu o genă C, formând o secvență completă funcțional ce codifică lanțul respectiv al imunoglobinei.

5. Interacțiunile genice în concepția actuală

Concepția clasică despre funcția genei postulează că expresia fenotipică a unei gene este influențată de alte gene alele sau nealele, precum și de acțiunea mediului. Aceste interacțiuni sunt mult mai evidente la nivel molecular.

Interacțiunile alelice exprimate prin relațiile de dominanță – recesivitate dintre alelele unei gene sunt valabile la nivel fenotipic, influențând expresia unui caracter. La nivel molecular se manifestă de obicei ambele alele ale unei gene, producând o proteină normală sau anormală, în cazul alelelor mutante. Uneori, anumite alele nu au nici un efect primar (alele amorfe/silențioase) cum sunt spre exemplu, alela 0 a sistemului de grup sangvin AB0[5] sau alelele mutante recesive pentru agamaglobulinemie sau afibrinogenemie. La heterozigoții *N/a*, alela mutantă *a* poate codifica o proteină (enzimă) nefuncțională; cantitatea totală de proteină/enzimă normală *se reduce la jumătate*, fiind totuși suficientă, în condiții bazale, pentru a asigura o funcție normală și, ca atare,

4. Aproape jumătate din gene au doi sau mai mulți promotori.
5. În România și alte țări est-Europene se folosește nomenclatura „0" (zero), în loc de O, semnificând lipsa antigenului A sau B.

BCU "CAROL I" CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

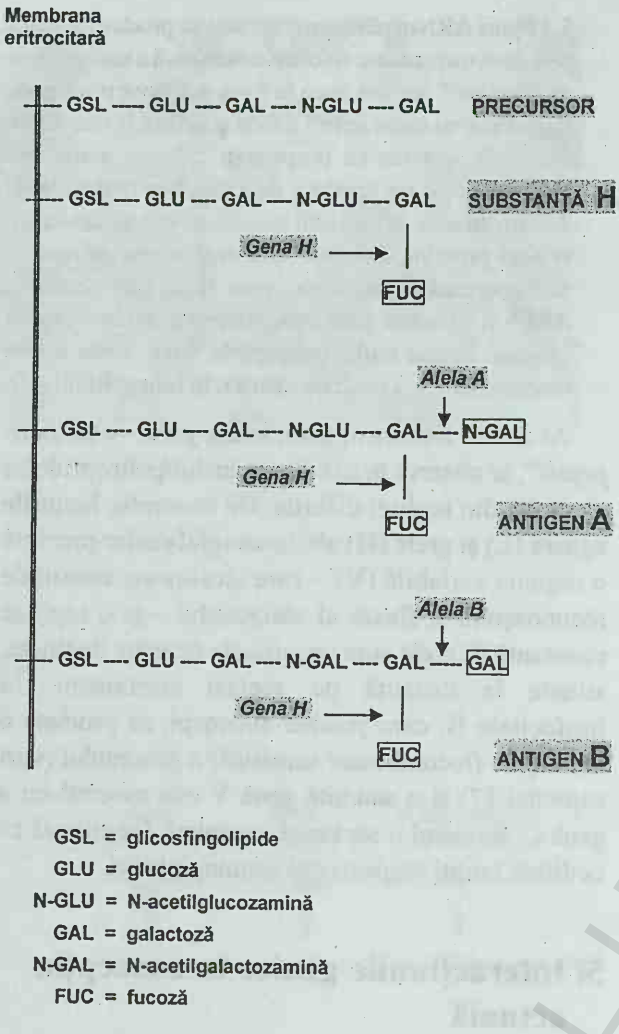


Figura 4.9. Interacțiunile nealelice dintre genele implicate în formarea antigenelor A,B, H pe suprafața hematiilor

individul să fie (aparent) sănătos (vezi trăsătura sicklemică).

Interacțiunile nealelice și în special fenomenul de **epistazie** pot fi demonstrate mai convingător la nivel molecular, prin *acțiunea coordonată* a mai multor gene ce intervin în producerea unui compus final. Un exemplu ilustrativ îl reprezintă formarea antigenelor ABH pe suprafața hematiilor și în secreții.

Antigenele A, B și H sunt macromolecule complexe prezente sub formă alcool-solubilă (glicosfingolipide) pe suprafața hematiilor și hidrosolubilă (glicoproteine) în secreții, dar numai la persoanele „secretoare". Antigenele ABH eritrocitare sunt glicosfingolipide complexe care au o parte centrală fixată cu un capăt în membrana eritrocitului; pe acest „miez" se leagă lateral, în zona extramembranară, mai multe catene glucidice. Specificitatea antigenică este determinată de glucidul terminal. Formarea antigenelor A, B, H este determinată de acțiunea coordonată a genelor H, Se și AB0 care, prin intermediul unor enzime (glicoziltransferaze), fixează diferite tipuri de glucide la axul sfingolipidic sau glicoproteic (figura 4.9).

- *Gena H* (localizată pe cromozomul 19) codifică una din enzimele galactozid 2-alfa-L-fucoziltransferază. Aceasta acționează asupra unui *precursor* și adaugă o moleculă de *fucoză*, formând *substanța H*. Au fost descrise două tipuri de alele: *H*, alelă dominantă, ce determină sinteza unei enzime funcționale, și *h*, alelă recesivă ce determină sinteza de enzime nefuncționale responsabile, în stare homozigotă, de „fenotipul Bombay".
- *Gena AB0*[6] (localizată pe cromozomul 9q34) produce o enzimă cu activitate de glicoziltransferază. Au fost descrise trei tipuri de alele: *alele A*, dominante – care codifică o alfa-1-3-N-acetil-galactosaminiltransferază, ce determină fixarea unei molecule de acetilgalactozamină pe substanța H, *alele B*, dominante – care codifică o alfa 1-3-galactosiltransferază, ce determină fixarea unei molecule de galactoză pe substanța H și *alela 0*, recesivă – care produce o proteină trunchiată inactivă și care nu va modifica substanța H.
- S-a înregistrat și situația foarte rară de homozigoți recesivi (*h/h*) pentru gena H la care precursorul nu este transformat în substanță H; alelele A sau B, deși sunt prezente, nu au efect și fenotipul (numit „*Bombay*") corespunde grupei 0 (dar fără substanță H).
- La secretori, alături de *gena H*, acționează și *gena Se* care codifică o altă enzimă alfa-(1,2)-L-fucosyltransferază. Aceasta va permite solubilizarea substanței H și excreția antigenelor A, B și H. Au fost identificate două tipuri de alele: *alela Se*, dominantă, ce permite modificarea substanței H, și *alele se*, recesive, care determină sinteza de proteine inactive, substanța H rămânând astfel netransformată și insolubilă. Gena Se are deci acțiune epistatică asupra genei H.

Efectul mediului asupra expresiei genelor se manifestă în reglajul cantitativ (și uneori calitativ) al sintezei proteinelor.

6. Analiza moleculară a genelor A, B, 0 a fost recent realizată. Între alelele A și B există o diferență de secvență de numai patru nucleotide. Alela 0 prezintă o deleție a unui nucleotid care (fiind o mutație „frameshift") determină pierderea activității transferazice.

RCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

C. Mecanismele moleculare ale expresiei genice

Expresia informației genetice se realizează în toate celulele pe baza unui *flux informațional, considerat unidirecțional și universal*[7], care se conformează dogmei centrale a geneticii: *ADN → ARNm → polipeptid (proteină)*. Prima etapă a expresiei informației ereditare este copierea informației din ADN într-o moleculă de ARN mesager; această etapă are loc în *nucleu* și *mitocondrii* și se numește **transcripție**. A doua etapă este sinteza unui polipetid, prin decodificarea (*traducerea*) informației din ARNm într-o anumită secvență de aminoacizi; acest proces are loc în citoplasmă, pe *ribozomi*, și este denumit **translație**. Realizarea acestor etape se bazează pe *principiul coliniarității*: o secvență liniară de nucleotide din ADN este copiată (complementar) într-o secvență liniară de nucleotide în ARN; apoi ea este decodificată (prin „citire" în grupe de trei nucleotide numite codoni) într-o secvență, de asemenea liniară, de aminoacizi ce formează un polipeptid. Întregul proces al exprimării informației genetice este supus unui riguros *control* care determină *tipul de celulă* în care se produce sinteza proteinei, precum și *momentul*, *cantitatea* și *ritmul* în care se desfășoară.

O contribuție remarcabilă la descifrarea mecanismelor moleculare ale transcripției la eucariote a avut-o Roger D. Komberg (premiul Nobel pentru chimie în 2006) care a descoperit structura tridimensională a ARN polimerazei II la nivelul atomic de rezoluție, nucleozomii și complexul proteic numit *mediator*.

Prezentarea noastră va urma linia geneticii moleculare „clasice" folosind și elementele noi furnizate în etapa „postgenomică" de *proiectul ENCODE* (aflat în derulare) care urmărește identificarea tuturor secvențelor funcționale din ADN, studiul factorilor ce controlează expresia genică și mecanismele prin care se realizează transcripția. Deși ne vom referi la transcripția genelor ce codifică proteine realizată de ARN polimeraza II vom reaminti (vezi subcapitolul 3.C.3.4) că transcripția este un fenomen mult mai amplu decât se credea anterior, interesează ambele catene ale ADN și regiunile intergenice.

1. Transcripția

1.1. Date generale

Transcripția este procesul de *copiere* a informației genetice a unei gene, sub formă *codificată*, *complementară* și *antiparalelă*, într-o moleculă de **ARN**. Acest proces are loc în nucleu și mitocondrii.

ARN este format din ribonucleotide, cu structura generală $[P\text{-}R\text{-}N]_n$, în care **P** = acid fosforic, **R** = riboza[8], iar **N** = baza azotată (Adenina, Guanina, Citozina și Uracilul). Prin polimerizarea ribonucleotidelor (în sensul 5'→3') rezultă o monocatenă, de obicei scurtă. Există mai multe tipuri de ARN, cu funcții diferite în sinteza proteinelor: ARN mesager (ARNm) este *codant* deoarece prin translație va determina sinteza unui polipeptid; ARN ribozomal (ARNr) (mai multe tipuri) va participa la formarea ribozomilor, iar ARN de transfer (ARNt) intervine direct în transportul aminoacizilor la ribozomi; există multe alte tipuri de ARN ce intervin în sinteza și reglarea proteinelor (vezi subcapitolul 3.C.3). În cele ce urmează, vom discuta mai ales transcripția ARNm realizată de ARN-polimeraza II.

Pentru sinteza *in vivo* a ARNm sunt necesare: *o catenă de ADN (transcrisă)* ce funcționează ca matriță, enzima *ARN-polimerază II* (pol II), *factori de transcripție* (TF) necesari pentru ghidarea și activarea ARN-polimerazei, un complex *mediator* între TF și pol II și *ribonucleotide* activate (sub formă de nucleozid-trifosfați).

(1). **Catena transcrisă.** Numai una dintre cele două catene ale ADN (3'→5') este transcrisă și servește ca „matriță" pentru sinteza unei molecule complementare și antiparalele (5'→3') de ARNm; dar, la gene diferite, transcripția (în direcția 3'→5') se poate face pe una sau cealaltă catenă a ADN (figura 4.10). Alegerea catenei transcrise depinde, în mare parte, de localizarea și orientarea *promotorului*, locul unde se fixează *ARN-polimeraza*, prin intermediul factorilor de transcripție.

ARNm, care se formează prin transcripție, va avea *aceeași secvență* de nucleotide (exceptând înlocuirea T cu U) și *același sens* (5' → 3') ca și catena ADN *netranscrisă* sau „catena de referință", motiv pentru care aceasta se numește **catenă sens**, iar catena transcrisă este numită adesea **antisens**[9].

7. În realitate fluxul informațional nu este exclusiv unidirecțional și universal: unele secvențe de ADN (retrotranspozoni) sunt transcrise în ARN și apoi sub acțiunea unei *transcriptaze* inverse sunt retrocopiate și integrate aleatoriu în ADN; prin același mecanism unele retrovirusuri (de exemplu, HIV) care au ca material genetic ARN se pot insera în ADN-ul celulelor eucariote prin retrotranscripție.
8. Riboza este „*oza*" (glucidul) descoperit la „Rockefeller Institut of Biochemistry" din New York.
9. Referirile la structura genei se fac întotdeauna la catena sens (de exemplu, *secvențele reglatoare de la capătul 5' al genei* se referă la secvențele situate la capătul 5' al catenei *sens* și nu al catenei transcrisă, unde de fapt ele există și acționează !!!).

BCU IAȘI - CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

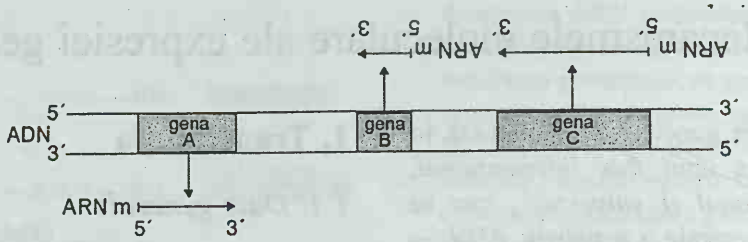


Figura 4.10. Catena transcrisă din ADN diferă de la genă la genă

5'...ATGTTACGACGT... 3' catena ADN „sens" (netranscrisă, de referinţă)

3'...TACAATGCTGCA... 5' catena ADN „antisens" (transcrisă)

Transcripţie

↓

5'...AUGUUACGACGU... 3' ARNm

Catena transcrisă prezintă în amonte (spre capătul 5') de regiunea codantă (alcătuită dintr-o alternanţă de exoni şi introni) o serie de secvenţe *cis-reglatoare* (*promotorul*[10] şi *secvenţe de reglare proximale şi distale* promotorului – prezentate în subcapitolul 3.B.1.2) care interacţionează cu factori de transcripţie (TF) *trans-reglatori*, ce determină împreună fixarea, poziţionarea şi activarea pol II, astfel ca transcripţia să înceapă exact la *situsul de start al transcripţiei* (SST)[11] (figura 4.11). *Fiecare genă posedă o combinaţie particulară de elemente cis-reglatoare.*

(2). **ARN polimeraza II** (RNAP sau pol II) „citeşte" şi transcrie catena matriţă a genelor ce codifică proteine (sintetizând o copie complementară şi antiparalelă de ARNm), precum şi numeroase gene ce codifică ARNsn sau ARNmi. Pentru a începe transcripţia la SST, pol II trebuie să se fixeze şi să se poziţioneze la promotor; enzima este însă „incapabilă" să facă singură acest lucru şi necesită pentru aceasta o varietate de TF generali.

ARN pol II este formată din 12 subunităţi ce realizează o structură tridimensională particulară (figura 4.12) care facilitează fixarea la ADN, desfacerea catenelor, polimerizarea ARN şi deplasarea enzimei în lungul catenei transcrise.

(3). **Factorii de transcripţie generali (TFII)**[12] se ataşează şi se asamblează secvenţial la promotor şi apoi recrutează pol II, formând împreună *complexul de iniţiere al transcripţiei.* O altă categorie de TF *speciali sau activatori* se fixează la elementele cis-reglatoare situate în amonte de promotor, influenţând momentul şi intensitatea transcripţiei. Vom reveni asupra TF în subcapitolul următor.

(4). **Mediatorul** este un complex multiproteic care funcţionează ca *activator* al TF şi ARN polimerazei II.

Înainte de a descrie procesul de transcripţie este necesar să precizăm un element important: toate celulele somatice (rezultate prin mitoze succesive din celula zigot) au aceeaşi informaţie genetică; diferenţierea lor structurală şi funcţională implică *expresia anumitor gene specifice* de tip celular sau tisular, care funcţionează împreună cu *genele*

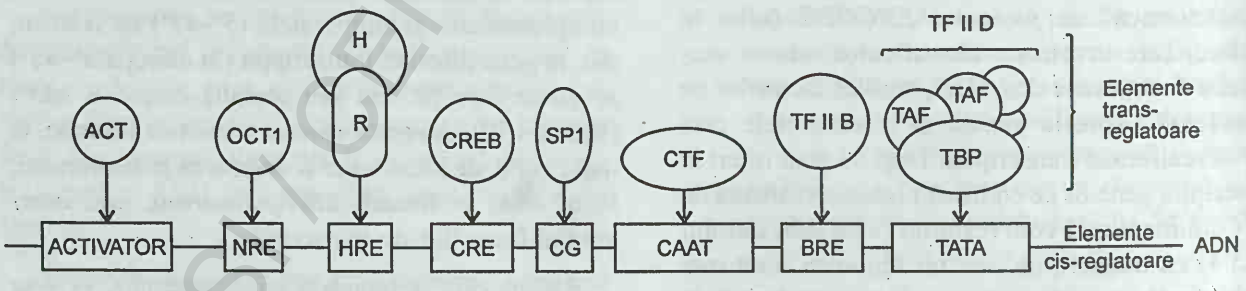


Figura 4.11. Schema unor elemente cis- şi trans-regulatoare situate pe o genă ipotetică

Reprezentarea schematică nu implică nici prezenţa nici ordinea tuturor elementelor cis-reglatoare menţionate şi nici fixarea simultană a tuturor factorilor trans-reglatori. Legendă: TF – factor de transcripţie; TBP – subunitate a FTIID care se fixează la secvenţa TATA; TAF – factori asociaţi TBP; BRE – elementul de recunoaştere a FTIIB; CTF – factor de transcripţie asociat la secvenţa CAAT; CRE – element de răspuns la AMPc; HRE – element de răspuns la hormon (H) ataşat printr-un receptor (R): NRE – element de reglare negativă; ACT – element activator (*enhancer*)

10. Reamintim că promotorul are o structură diferită atât la gene din clase diferite care sunt transcrise fiecare de una din cele trei ARN polimeraze, cât şi la gene diferite (comune sau specifice) transcrise de pol II.
11. Numeroase gene au mai multe SST alternative, fiecare operând cu eficienţă diferită.
12. TF II, în număr de şase (A, B, D, E, F, H), sunt codificaţi de gene diferite şi alcătuiţi fiecare din mai multe subunităţi; migrarea şi fixarea lor la elementele *cis-reglatoare* este determinantă pentru demarajul transcripţiei (într-un anumit moment şi tip celular).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

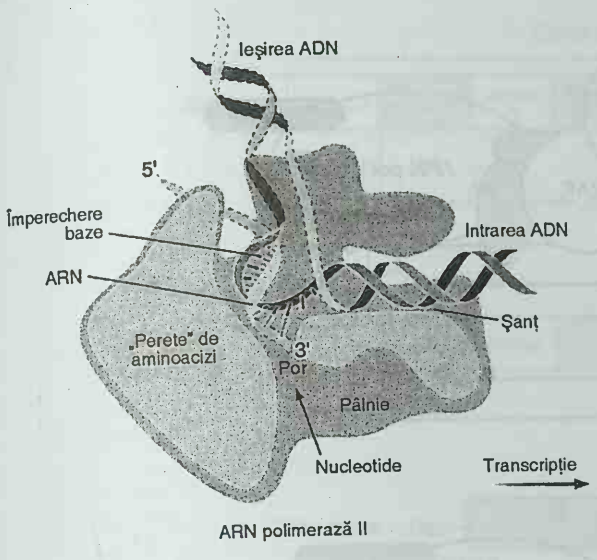


Figura 4.12. Structura şi funcţia ARN polimerazei II (modificat după Pierce, 2008)

ADN bicatenar intră în enzimă printr-un „şanţ" şi ajunge în „situsul activ", unde este „îndoit" în unghi drept şi cele două catene se desfac parţial, eliberând catena matriţă; ribonucleotidele activate pătrund printr-un „por" şi sunt fixate complementar la catena transcrisă a ADN. Moleculele de ADN şi ARNm părăsesc enzima prin două regiuni diferite.

comune ce controlează metabolismul celular (vezi capitolul 3.B.2). De aceea, expresia genelor specific tisulare implică *activarea selectivă a acestor gene* (prin intervenţia unor molecule specific tisulare), recunoaşterea lor de către ARN-polimerază şi modularea expresiei lor ca moment, cantitate şi ritm.

Fără a intra în detalii, vom preciza că desfăşurarea acestor procese este condiţionată de realizarea unei *configuraţii „deschise"* sau, altfel spus, de *remodelarea cromatinei* (în care ADN este compactat sub forma filamentului cu nucleozomi) în teritoriile ce vor fi transcrise; prin relaxarea (*decondensarea*) structurii sale (produsă de acetilarea histonelor şi deplasarea nucleozomilor) genele devin accesibile ARN polimerazei şi proteinelor reglatoare.

Procesul de transcripţie la eucariote se desfăşoară în două mari etape, interdependente[13], determinate de structura „discontinuă" („fragmentată") a genelor eucariote. Acestea sunt:

- *formarea ARN mesager precursor* (pre-ARNm) sau transcriptul primar[14], prin transcripţia integrală a genei (exoni şi introni);
- *maturarea pre-ARNm*, printr-o serie de modificări din care rezultă ARNm matur, ce va trece în citoplasmă.

1.2. Formarea ARNm precursor

După modificarea locală a cromatinei, formarea pre-ARNm se realizează în trei mari etape:

(1) *Iniţierea transcripţiei.* Primul „pas" al transcripţiei este fixarea şi poziţionarea *ARN-polimerazei* în regiunea *promotor* (alcătuită din secvenţele „consens" TATA box, CCAAT box şi GC box), astfel ca transcripţia să poată începe în „situsul de start" (SST sau Inr) cu primul nucleotid (numerotat „+1"). Trebuie subliniat că *ARN-polimeraza nu poate recunoaşte direct promotorul şi nici nu poate iniţia singură transcripţia.* Pentru aceasta, sunt necesari o serie de **factori de transcripţie generali** (TF II sau de clasă II) care se fixează secvenţial pe elementele promotorului pentru *a recruta, ghida şi activa ARN-polimeraza.* Enzima şi factorii de transcripţie formează **complexul de iniţializare** sau aparatul transcripţional bazal.

Primul „actor" este TFIID care (prin subunitatea TFB şi alte molecule, numite TAF) se fixează la secvenţa TATA (sau alte secvenţe similare la promotorii fără TATA box) (figura 4.13.A); apoi se fixează alţi cinci TF (în ordine, A, B, F, E şi H) care, prin intermediul complexului mediator, recrutează şi fixează ARN pol II – formând complexul de iniţializare. Sub acţiunea TFII E şi H se desfac cele două catene ale ADN, este activată ARN pol II şi începe transcripţia (la un nivel minim, bazal); modularea transcripţiei se face de către *activatori* sau *represori* care, fiind situaţi la distanţă de promotor, sunt „aduşi" în această regiune printr-o modificare (buclă) a ADN (figura 4.13.B).

(2) *Transcripţia propriu-zisă (elongaţia).* ARN polimeraza II şi unii TF se deplasează în lungul moleculei de ADN; cele două catene se separă (prin acţiunea TFIIH, cu acţiune de *helicază*), eliberându-se catena transcrisă 3'→5', care serveşte drept matriţă (tipar) pentru aşezarea *secvenţială şi complementară a ribonucleotidelor activate*[15]; ele vor fi apoi polimerizate de către ARN-polimerază, formându-se ARNm precursor, în care sunt copiaţi atât exonii, cât şi intronii. *Transcripţia se face numai în sensul 5'→3'* (deci ARNm este *antiparalel* faţă de catena transcrisă), fapt ce asigură fidelitatea „citirii" informaţiei genetice.

ARNm se desprinde treptat de pe catena transcrisă (rămânând fixat temporar numai la capătul 3'), iar cele două catene ale ADN se reunesc şi refac dublul helix.

(3) *Terminarea transcripţiei* se face când ARN-polimeraza întâlneşte *situsul de terminare a*

13. Prezentarea lor separată este mai mult „didactică" deoarece, în realitate ele se derulează aproape concomitent.
14. Moleculele de transcript primar au fost denumite iniţial *ARN nuclear heterogen (ARNhn).*
15. În acest proces intervin şi anumiţi *„factori de elongaţie"*.

ROMANIAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

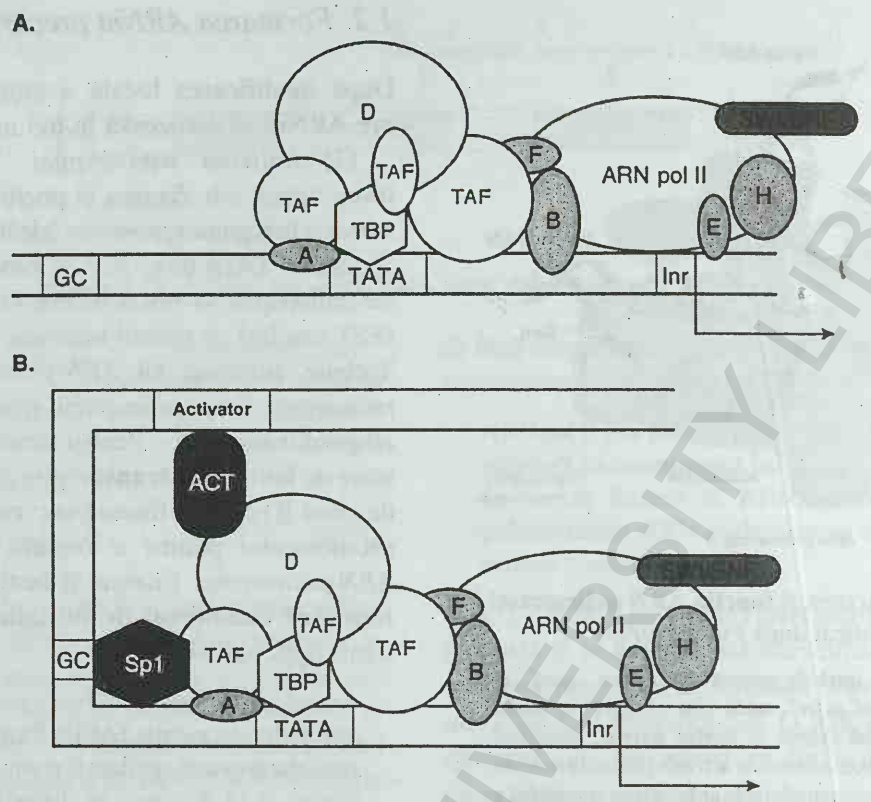


Figura 4.13. Formarea complexului transcripţional bazal (de iniţializare)

(Modificat după Jorde *et al.*, 1999 şi Haffee, 2000)

A. Complexul transcripţional bazal format prin fixarea factorilor transcripţionali generali (la secvenţa TATA) şi ARN polimerazei II (la situsul de start al transcripţiei – Inr); TBP este o subunitate a TFIID; TAF sunt factori asociaţi TBP. După fixarea TFIID se fixează secvenţial şi alţi GTF care fixează şi poziţionează ARN polimeraza. Este indicat deasemeni complexul multiproteic SW1/SNF care funcţionând ca o helicoză desface structura cromatinei (filamentul cu nucleosomi). B. Activarea complexului transcripţional bazal prin intervenţia TF Sp1, fixat la secvenţa GC, şi a unei proteine activatoare (ACT) fixate la elementul cis de activare (activator).

transcripţiei; aici se află secvenţa AATAAA (citită pe catena netranscrisă) care semnalează clivarea 3' a transcriptului primar. Secţionarea ARNm sintetizat[16] are loc (sub acţiunea unei exonucleaze) la 15-30 nucleotide în aval de *situsul de poliadenilare*.

Transcripţia unei gene poate fi realizată de mai multe molecule de ARN-polimerază, formându-se mai multe copii de ARNm ce conţin aceeaşi informaţie genetică (această „amplificare" va creşte considerabil în cursul translaţiei şi astfel o genă va determina mii de molecule proteice identice).

1.3. Maturarea ARNm precursor

Transcriptele formate (ARNm precursor) suferă un proces de *maturare nucleară* ce cuprinde două procese distincte (derulate pe măsura realizării transcripţiei), destinate să facă ARNm mai *„disponibil şi mai util"* translaţiei (figura 4.14).

a) Modificarea extremităţilor ARNm precursor determină creşterea *stabilităţii* sale (protecţie la degradarea de către endonucleaze) şi facilitează *transportul* în citoplasmă, precum şi *recunoaşterea* şi *fixarea* sa la subunitatea 40S a ribozomului.

- La *capătul 5'* se adaugă, la primul nucleotid al transcriptului primar, o moleculă de 7-metil-guanozină, ce formează o structură specială, numită în limba engleză *„cap"* (*„capac"*, *„bonetă"* sau *„calotă"*);
- La *extremitatea 3'* se adaugă (prin acţiunea unei poli-A polimeraze) o serie de 50-200 de nucleotide cu adenină, formând o *„coadă" poliadenilică*. Această operaţie de poliadenilare este caracteristică ARNm (există o singură excepţie: ARNm pentru histone). La „coada poliadenilică" se asociază proteina PABP (*„PolyA Binding Protein"*) indispensabilă supravieţuirii celulare, asigurând protecţia şi stabilitatea ARNm, precum şi iniţierea translaţiei.

b) Procesarea ARNm precursor. Aşa cum am precizat, transcriptul primar ARN conţine secvenţe

16. Pentru multe gene clivarea se produce în poziţii diferite, rezultând produşi de transcripţie diferiţi.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

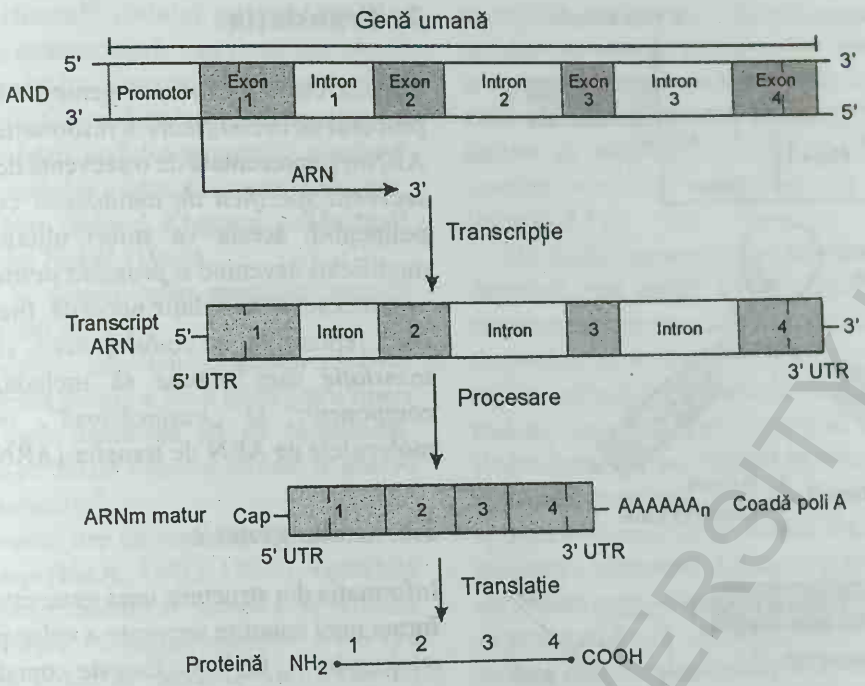


Figura 4.14. Transcripția unei gene umane „tipice" și procesarea transcriptului primar în ARNm matur

complementare cu întreaga regiune transcrisă din genă (zona centrală sau cadrul de lectură) ce conține exoni (regiuni exprimate, codante) și introni (regiuni intercalare, necodante). Pe măsură ce se sintetizează, transcriptul ARN primar suferă o procesare complexă ce constă în *decuparea precisă și eliminarea ARN intronic* urmată de *înnădirea (legarea)* „cap la cap" a ARN exonic, care va forma **ARNm matur**, alcătuit dintr-o serie continuă și contiguă de exoni. Aceste fenomene sunt denumite „*splicing*" în limba engleză, „*épissage*" în limba franceză; termenii corespund cuvântului românesc „**matisare**", termen tehnic care se referă la „*înnădirea a două capete*". *Excizia și reunirea* sunt operații foarte delicate care trebuie să fie *deosebit de precise*: o eroare de decupare cu un singur nucleotid schimbă „cadrul de lectură" și, după translație, va produce o proteină anormală.

Procesul este dependent de existența unor secvențe nucleotidice-semnal situate la granița exoni-introni: **5'GT** (GU în ARN) sau *situs donor* și **3'AG** sau *situs acceptor*; o altă secvență importantă situată foarte aproape de capătul 3' al intronului este *situsul de conexiune sau de legătură* („*branch site*"), ce conține nucleotidul **A**. Mecanismul de decupare (figura 4.15) se derulează în trei etape: (1) secționarea joncțiunii exon-intron 5'GU; (2) atașarea nucleotidului terminal G la nucleotidul A al situsului de branșare și formarea unei structuri în lasou/buclă; (3) secționarea intronului la joncțiunea 3'AG, îndepărtarea lui și unirea segmentelor de ARN exonic. Reacțiile sunt mediate de un complex ARN-proteine („*spliceosome*") ce cuprinde cinci tipuri de **ARNsn** („*small nuclear*") (U1, U2, U4, U5 și U6) și numeroase **proteine Sm și SMN**[17].

Ordinea exonilor în ADN și transcriptul primar sunt păstrate în ARNm matur. Dar există o anumită flexibilitate în utilizarea exonilor, în sensul că (sub acțiunea unor factori puțin cunoscuți), în celule diferite, vor fi „reținuți" în ARNm matur numai o parte din exoni, alții putând fi îndepărtați odată cu intronii. Prin acest proces de **matisarea alternativă** (sau diferențială) a exonilor transcriptul primar al genei poate produce mai multe tipuri de ARNm; ele vor determina fie proteine înrudite (izoforme) cu funcții analoage (de exemplu, mielina sau troponina C), fie proteine complet diferite (de exemplu, gena calcitoninei va produce în celulele C ale tiroidei precursorul calcitoninei, iar în creier precursorul unui neuromediator numit CGRP) (figura 4.16).

1.4. Controlul calității ARNm

În cursul transcripției și al matisării se produc frecvent erori (la circa 20% din transcripte): persistența unuia sau mai multor introni, absența codonului stop sau prezența unor codoni stop prematuri. Celulele posedă mecanisme[18] de detecție și degradare a ARNm

17. Mutațiile genei ce codifică proteinele SMN („*Survival of Motor Neurons*") produc amiotrofia spinală.
18. Mecanismele de supraveghere a ARN sunt multiple și complexe: *Nonsense Mediated mRNA Decay* (NMD), *Nonstop Mediated Decay* (NSM), *No-go Mediated decay* (NGD) ș.a. Descrierea lor depășește cadrul acestei lucrări. Degradarea ARN se face de către un complex multiproteic numit „*exosome complex*" (sau complexul PM/Sci).

BCU CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

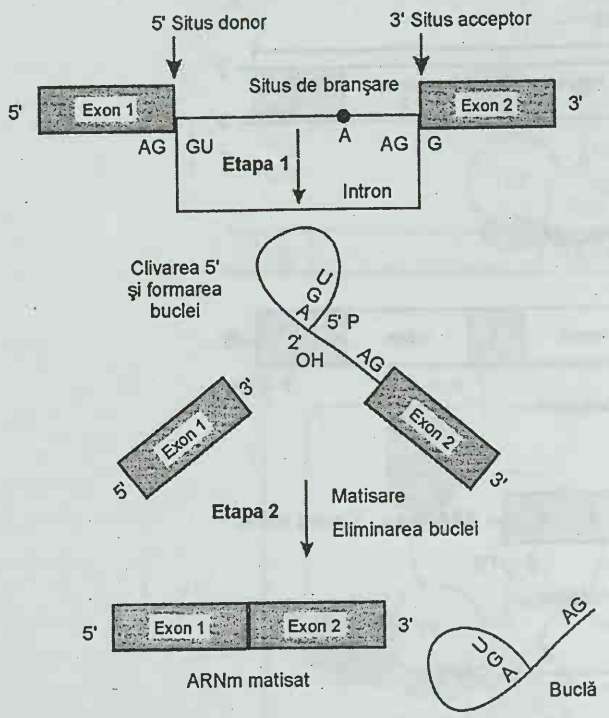


Figura 4.15. Matisarea ARNm precursor şi formarea ARN matur

anormali, colectiv denumite **mecanismele de supraveghere a ARN**, care asigură calitatea şi fidelitatea moleculelor de ARNm. Acest proces de „protecţie" este important deoarece transcriptele anormale produc proteine anormale, deseori cu efect toxic.

2. Translaţia

A doua etapă a expresiei genice este **translaţia** - procesul de *decodificare* a informaţiei genetice din ARNm (reprezentată de o secvenţă de codoni) într-o *secvenţă specifică de aminoacizi* ce formează un polipeptid; acesta va suferi ulterior o serie de modificări devenind o *proteină activă.*

Procesul de translaţie necesită, firesc, „un dicţionar", reprezentat de *codul genetic*, şi un *aparat de translaţie* care trebuie să includă, printre alte componente, şi „*traducătorul*", reprezentat de moleculele de ARN de transfer (ARNt).

2.1. Codul genetic

Informaţia din structura unei gene este „scrisă" sub forma unei anumite secvenţe a celor patru tipuri de nucleotide: A, G, T, C. Ea este copiată (transcrisă) complementar (U, C, A, G) în ARNm şi apoi „tradusă" într-o anumită secvenţă de aminoacizi, care vor forma o catenă polipeptidică; această *translaţie* se face cu ajutorul unui fel de „*dicţionar bilingv*" care este **codul genetic.**

Codul genetic reprezintă „*un sistem de corespondenţe*" între o anumită secvenţă de trei nucleotide numită **codon** şi un anumit aminoacid (tabelul 4.1). Cu cele patru litere ale „alfabetului" genetic se pot scrie „cuvinte" alcătuite din trei litere; gena ar fi deci „o frază" formată dintr-o înşiruire de codoni, ce determină o anumită secvenţă a aminoacizilor într-un

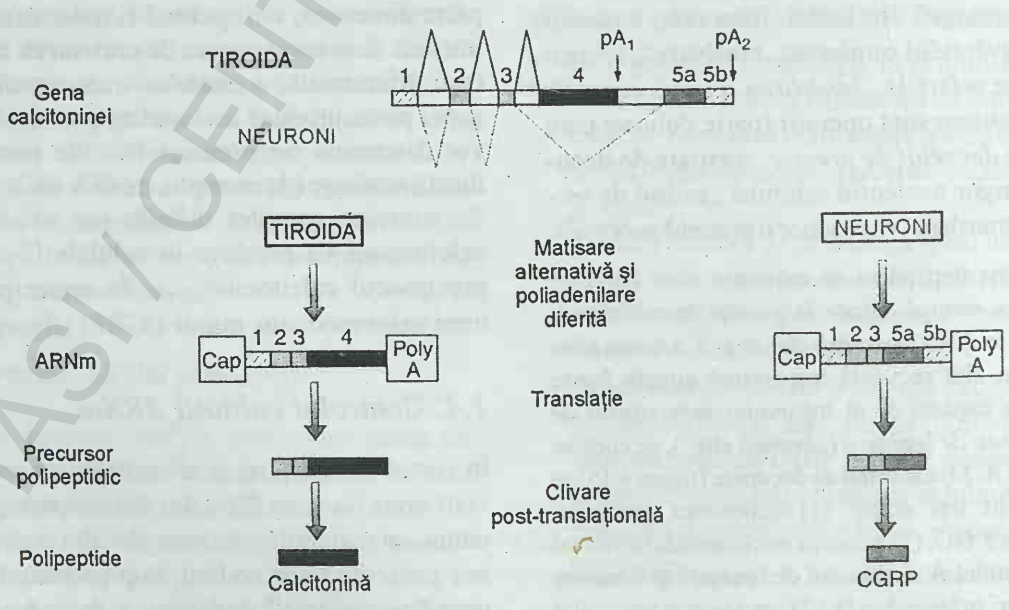


Figura 4.16. Fenomenul de selecţie al exonilor şi matisare alternativă prin care o genă poate codifica mai multe proteine

(modificat după Strachan şi Read,1999)

Gena pentru calcitonină este procesată diferit în ţesutul nervos şi tiroidă formând polpiepetide diferite: calcitoninei şi peptidul înrudit cu calcitonina (CGRP)

BCU IAŞI / CEITRAL UNIVERSITY LIBRARY

polipeptid. Descifrarea[19] codului genetic (1965) a fost o descoperire extraordinară, *mai fantastică decât descifrarea hieroglifelor*, deoarece a marcat decisiv debutul erei biologiei moleculare. Recunoaşterea importanţei descifrării codului genetic şi a rolului său în sinteza proteinelor a adus descoperitorilor săi, Robert Holley, Har Gobind Khorana şi Marshall Nirenberg, premiul Nobel (1968).

Fără a intra în detalii, vom menţiona succint proprietăţile codului genetic.

(1) *Codul genetic este triplet* pentru motivul logic că 3 este prima putere a lui 4 (cele patru tipuri de nucleotide) care formează 64 de combinaţii, suficiente pentru cei 20 de aminoacizi care se găsesc în structura proteinelor[20].

(2) *Codul genetic are un codon iniţiator (AUG) şi trei codoni stop* (UAA, UAG, UGA), veritabile semne de punctuaţie cu care se începe şi se termină sinteza polipeptidului. Codonul iniţiator AUG (cu care se începe *„cadrul deschis de lectură"*) semnifică metionina. Codonii stop sunt numiţi şi *„codoni nonsens"* deoarece nu semnifică nici un aminoacid; ei semnalează încheierea sintezei şi eliberarea polipeptidului format (prin fixarea unor *factori de eliberare*). Ceilalţi 61 de codoni sunt *„codoni sens"* ce semnifică 20 de aminoacizi (tabelul 4.1).

(3) *Codul genetic este degenerat (redundant)* deoarece mai mulţi codoni semnifică un acelaşi aminoacid, numiţi *codoni sinonimi*. Exceptând metionina şi triptofanul, codificaţi de un singur codon, ceilalţi 18 aminoacizi sunt codificaţi de 2-6 codoni, deosebiţi *deseori* prin al treilea nucleotid. Redundanţa nu s-a stabilit la întâmplare deoarece aminoacizii cei mai reprezentaţi în proteine sunt cei specificaţi de mai mulţi codoni. Cu toată conotaţia sa peiorativă, caracterul degenerat al codului genetic este un avantaj pentru celulă deoarece unele mutaţii genice ce produc codoni sinonimi nu modifică proteina codificată de genă (mutaţii *silenţioase* sau *izo-semantice*).

Tabelul 4.1. Codul genetic

PRIMA BAZĂ	A DOUA BAZĂ								A TREIA BAZĂ
	U		C		A		G		
U	UUU	phe	UCU	ser	UAU	tyr	UGU	cys	U
	UUC	phe	UCC	ser	UAC	tyr	UGC	cys	C
	UUA	leu	UCA	ser	UAA	stop	UGA*	stop	A
	UUG	leu	UCG	ser	UAG	stop	UGG	trp	G
C	CUU	leu	CCU	pro	CAU	his	CGU	arg	U
	CUC	leu	CCC	pro	CAC	his	CGC	arg	C
	CUA	leu	CCA	pro	CAA	gln	CGA	arg	A
	CUG	leu	CCG	pro	CAG	gln	CGG	arg	G
A	AUU	ile	ACU	thr	AAU	asn	AGU	ser	U
	AUC	ile	ACC	thr	AAC	asn	AGC	ser	C
	AUA	ile	ACA	thr	AAA	lys	AGA	arg	A
	AUG	met	ACG	thr	AAG	lys	AGG	arg	G
G	GUU	val	GCU	ala	GAU	asp	GGU	gly	U
	GUC	val	GCC	ala	GAC	asp	GGC	gly	C
	GUA	val	GCA	ala	GAA	glu	GGA	gly	A
	GUG	val	GCG	ala	GAG	glu	GGG	gly	G

Abrevieri pentru aminoacizi

ala (A) – alanina
arg (R) – arginina
asn (N) – asparagina
asp (D) – acidul aspartic
cys (C) – cisteina
gln (Q) – glutamina
glu (E) – acidul glutamic
gly (G) – glicina
his (H) – histidina
ile (I) – isoleucina
leu (L) – leucina
lys (K) – lizina
met (M) – metionina
phe (F) – fenilalanina
pro (P) – prolina
ser (S) – serina
thr (T) – treonina
trp (W) – triptofanul
tyr (Y) – tirozina
val (V) – valina
X – stop

* în anumite condiţii UGA poate specifica *selenocisteina* (al 21-lea aminoacid)

19. Codul genetic a fost descifrat experimental folosind drept ARNm polinucleotide sintetice cu o secvenţă cunoscută şi analizând secvenţa de aminoacizi a proteinei sintetizate artificial. De exemplu, ARNm sintetic poliuracil a produs un polipeptid alcătuit exclusiv din fenilalanină, stabilindu-se astfel că tripletul UUU codifică fenilalanina.
20. În structura proteinelor au fost identificaţi încă doi aminoacizi (non-standard), *selenocisteina* şi *pirolizina*, care însă nu există în stare liberă; ei sunt codificaţi, în anumite condiţii, de codonii stop UGA şi respective UAG.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se poate afirma că această proprietate a codului genetic este un veritabil *sistem de protecţie contra efectelor mutaţiilor.*

(4) *Codul genetic este nesuperpozabil* (deoarece codonii vecini nu au un nucleotid comun) *şi fără virgule* (întrucât codonii sunt adiacenţi, neseparaţi printr-un nucleotid, cu rol de „virgulă"); codonii sunt definiţi prin *simpla grupare de câte trei.* Dacă, printr-o mutaţie, într-unul dintre codoni se suprimă (deleţie) sau se inseră (adiţie) 1-2 nucleotide (sau un alt număr care nu este un multiplu de trei) se produce *o decalare a cadrului de lectură al genei*, rezultând, printr-o nouă grupare de câte trei, alţi codoni. Astfel, în proteina sintetizată se modifică *toţi* aminoacizii, începând cu locul în care s-a produs mutaţia (numită *„frameshift"*) (tabelul 4.2).

(5) *Codul genetic este lipsit de ambiguitate*, întrucât un codon semnifică întotdeauna un anumit aminoacid, totdeauna acelaşi.

(6) *Codul genetic este aproape universal*, acelaşi la toate organismele: bacterie, plantă, animal sau om. Totuşi, codul genetic mitocondrial are câteva mici diferenţe faţă de cel nuclear (codoni cu sensuri diferite); unele variante ale codului genetic au fost găsite şi la levuri, parameci sau unele arheobacterii. Cu toate aceste foarte mici excepţii, caracterul universal al codului genetic este evident. Acest lucru este foarte important în „ingineria genetică" deoarece bacteriile recombinante, în care s-a introdus o genă umană, fabrică proteina umană folosind codul genetic bacterian care, în fond, este acelaşi ca şi la om.

Înainte de a încheia, vom sublinia importanţa cunoaşterii codului genetic şi pentru înţelegerea mecanismului şi a consecinţelor unor mutaţii genice (punctiforme) ce produc înlocuirea sau inserţia/adiţia unui nucleotid (tabelul 4.2) (vezi capitolul 7.B.2).

2.2. Aparatul de translaţie

Aparatul de translaţie este alcătuit din numeroase componente: ARNm, ribozomi, ARNt, aminoacizi, factori de iniţiere, factori de elongaţie, enzime, surse de energie etc. În sinteză, ARNm furnizează informaţia (secvenţa de codoni) care va fi translată într-o secvenţă de aminoacizi în proteină; el se fixează pe ribozom (o particulă alcătuită din ARNr şi proteine) şi care reprezintă platforma de sinteză a polipeptidului. ARNt fixează un aminoacid specific şi apoi amplasează acest aminoacid în polipeptid, folosind informaţia din ARNm.

a) Ribozomii sunt organite citoplasmatice (descrise de George Emil Palade, premiul Nobel în 1974), veritabile *„platforme de asamblare a aminoacizilor în proteine"* pe baza instrucţiunilor ARNm. Ribozomii eucariotelor sunt alcătuiţi din două subunităţi inegale (40S şi 60S) care se deosebesc prin constanta de sedimentare (S); ele sunt de obicei disociate şi libere în citoplasmă; ele *se reunesc* la începutul translaţiei pentru a forma *ribozomul activ.* Fiecare subunitate este alcătuită din **ARN ribozomal** şi proteine[21], care au rol structural şi funcţional/

Tabelul 4.2. Consecinţele unor mutaţii genice prin substituţia, inserţia sau adiţia unui nucleotid într-un codon

Mutaţii prin substituţia unui nucleotid AUG UGU AAA CCA Met cis lys pro		
Mutaţie silenţioasă	**Mutaţie cu sens greşit (*missens*)**	**Mutaţie nonsens**
AUG UGC AAA CCA Met cis lys pro	AUG UGG AAA CCA Met trp lys pro	AUG UGA AAA CCA Met **Stop**
Inserţia sau deleţia unui nucleotid AUG UUU AAA GUU UCG Met – Phe – Lys –Val – Ser		
Mutaţii cu decalarea cadrului (*frameshift*) AUG UUU GAA AGU UUC G Met – Phe – Glu – Ser – Phe	AUG UUU AA-G UUU CGA Met – Phe – Lys – Leu– Arg	

21. La eucariote subunitatea mică are un tip de ARNr (18S) şi 33 proteine ribozomale, iar cea mare trei tipuri de ARNr (5S, 5,8S, 28S) şi 45 proteine ribozomale. Moleculele de ARNr sunt codificate de gene prezente în mii de copii pe braţele scurte ale cromozomilor acrocentrici, care formează *„regiunile organizatoare de nucleoli"*. Structura ARNr şi a proteinelor ribozomilor la procariote este diferită de cea de la eucariote şi acest lucru are o importanţă deosebită deoarece unele antibiotice (de exemplu, streptomicina) care acţionează la nivelul ribozomilor sunt active la bacterii şi fără efect asupra ribozomilor şi sintezei proteice la om.

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

catalitic (facilitează fixarea moleculelor de ARNm și ARNt la ribozom, deplasarea ribozomului ș.a.). Ribozomii prezintă patru *situsuri funcționale*: pe subunitatea mică se află situsul de fixare al extremității 5' a ARNm, iar pe subunitatea mare: situsul P (*peptidil*) și A (*aminoacil*) unde se fixează moleculele de ARNt cuplate cu aminoacizii lor specifici, precum și situsul de ieșire (E – de la *exit*). În procesul de translație, ribozomii *se deplasează* în lungul moleculei de ARNm, spre capătul 3'. Pe măsura deplasării, alți ribozomi pot începe translația aceleiași molecule de ARNm, alcătuind împreună un **poliribozom**.

b) ARN de transfer (ARNt) *transportă* aminoacizii din citoplasmă la ribozomi, locul sintezei proteice. Aici, ARNt *recunoaște* codonul din ARNm corespunzător aminoacidului respectiv, pe care îl poziționează în dreptul acestui codon; deci ARNt are rolul de „translator".

ARNt este un micropolimer de ribonucleotide (75-85 nucleotide), monocatenar, cu o structură secundară și terțiară „în treflă", cu trei *„brațe"* bicatenare și patru *„bucle"* (figura 4.17), relativ identică la toate tipurile de ARNt. El posedă două situsuri importante:

- extremitatea 3'OH este terminată prin *nucleotidele CCA*, iar la poziția 3' a ribozei din structura nucleotidului cu adenină se fixează aminoacidul transportat, cu ajutorul unei enzime *aminoacil--ARNt-sintetaza*;
- *anticodonul*, un grup de trei nucleotide situat în bucla opusă extremității 3'OH; el recunoaște, prin complementaritate, codonul din ARNm corespunzător aminoacidului[22].

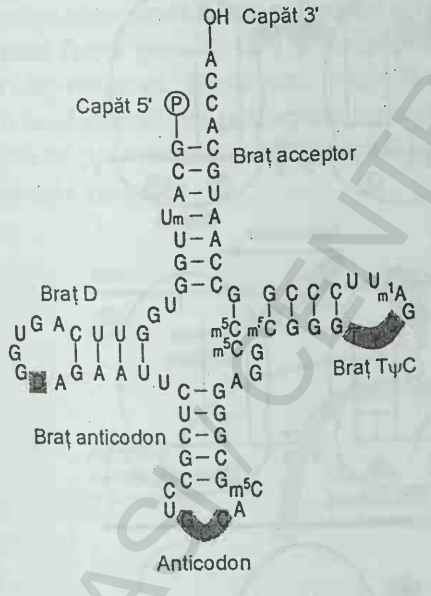


Figura 4.17. Structura bidimensională a ARN de transfer
(după Strachan și Read, 1999)

c) Enzimele și cofactorii proteici ai translației sunt de asemenea elemente importante. În procesul de translație sunt implicate amino-acil-ARNt-sintetazele și peptidil-transferaza. *Aminoacil-ARNt sintetazele* sunt 20 de enzime cu o dublă specificitate: fiecare recunoaște un anumit aminoacid (foarte probabil pe baza mărimii și conformației radicalului), precum și ARNt sau ARNt izo-acceptori corespunzător(i) (pe baza secvenței lor nucleotidice)[23]. În acest proces de „încărcare", mecanismul de recunoaștere între o anumită enzimă și ARNt specific a fost recent descifrat: enzima recunoaște specific fie o pereche de nucleotide (de exemplu, UG pentru enzimă+alanină) situate spre extremitățile terminale 5' și 3' ale ARNt, fie anticodonul unor molecule de ARNt; ele formează un veritabil *al doilea cod genetic*. *Peptidil-transferaza* catalizează formarea legăturii peptidice între doi aminoacizi. *Cofactorii proteici* intervin în diferite etape ale translației. Ei sunt reprezentați de *factorii de inițiere* (eIF 1-6)[24], *factorii de elongație* (EF 1-2) și un *factor de terminare* (RF). Inactivarea lor (de exemplu, prin diferite toxine microbiene) blochează procesul de translație și produce moartea celulară.

2.3. *Procesul de translație*

Translația se realizează în patru etape succesive: inițierea, elongația și terminarea translației (figura 4.18); fiecare etapă implică molecule diferite și necesită energie (furnizată de ATP sau GTP).

În prima etapă de **activare** un anumit aminoacid este fixat covalent (prin grupul carboxil) la ARNt corespunzător, grație enzimei cheie *aminoacil-ARNt sintetaza*; procesul se realizează cu mare fidelitate datorită activității corectoare a enzimei, care recunoaște și îndepărtează orice aminoacid incorect încărcat.

Inițierea translației este o etapă complexă care, în esență, va plasa primul aminoacid (AA-1) al proteinei (de la extremitatea sa NH_2-terminală) în

22. Teoretic ar trebui să existe în celulă 61 de molecule diferite de ARNt pentru cei 61 de codoni sens. În realitate numărul lor este mai mic (~40), dar superior celor 20 de aminoacizi; deci un același tip de aminoacid va fi purtat de mai mulți ARNt specifici (izo-acceptori), diferiți prin al treilea nucleotid din anticodonul lor; această flexibilitate este denumită în limba engleză *„wobble"* (*„ezitare"*).
23. Majoritatea aminoacid-ARNt sintetazelor au un domeniu de recunoaștere a unui dinucleotid din coada ARNt; acest mod de identificare corespunde unui veritabil „al doilea cod genetic".
24. eIF – de la *„eukaryotic Initiation Factor"*.

BUCUREȘTI BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

dreptul codonului inițiator AUG din ARNm, ce corespunde metioninei, și va asambla în această poziție cele două subunități ce vor forma ribozomul activ.

Într-un prim timp, ARNm se fixează (cu 5' *cap* și secvența 5'CCACC**AUG**C-3') pe subunitatea mică a ribozomului[25]; apoi, se formează un *complex de inițiere* între ARNm, ARNt-1 sau inițiator „încărcat" cu metionină (plasat în dreptul codonului inițiator AUG) și diferiți factori de inițiere ai translației (IF2, IF3) cu rol catalizator. Apoi, prin acțiunea unui alt IF, se fixează subunitatea mare 60S și ribozomul devine *activ*, deci capabil să participe la sinteza polipeptidică. ARNt-inițiator se va plasa direct în situsul P al ribozomului (figura 4.18).

Elongația este o etapă relativ simplă și repetată succesiv, în cursul căreia se formează legături peptidice între aminoacizii așezați secvențial pe baza ordinii codonilor din ARNm.

După plasarea ARNt-1 (încărcat cu primul aminoacid, AA-1)în poziția P a ribozomului, în situsul A (amino-acil) liber vine și se plasează ARNt-2 încărcat cu aminoacidul 2 (AA-2), codificat de al doilea codon din ARNm. În acest moment, sub acțiunea enzimei *peptidil-transferaza* se realizează *legătura peptidică* între primii doi aminoacizi, formându-se un dipeptid (legat la ARNt-2). După formarea dipeptidului, sub influența factorului de elongație EF2, GTP și a unei *translocaze*, ribozomul se deplasează (proces numit *translocație*) cu trei

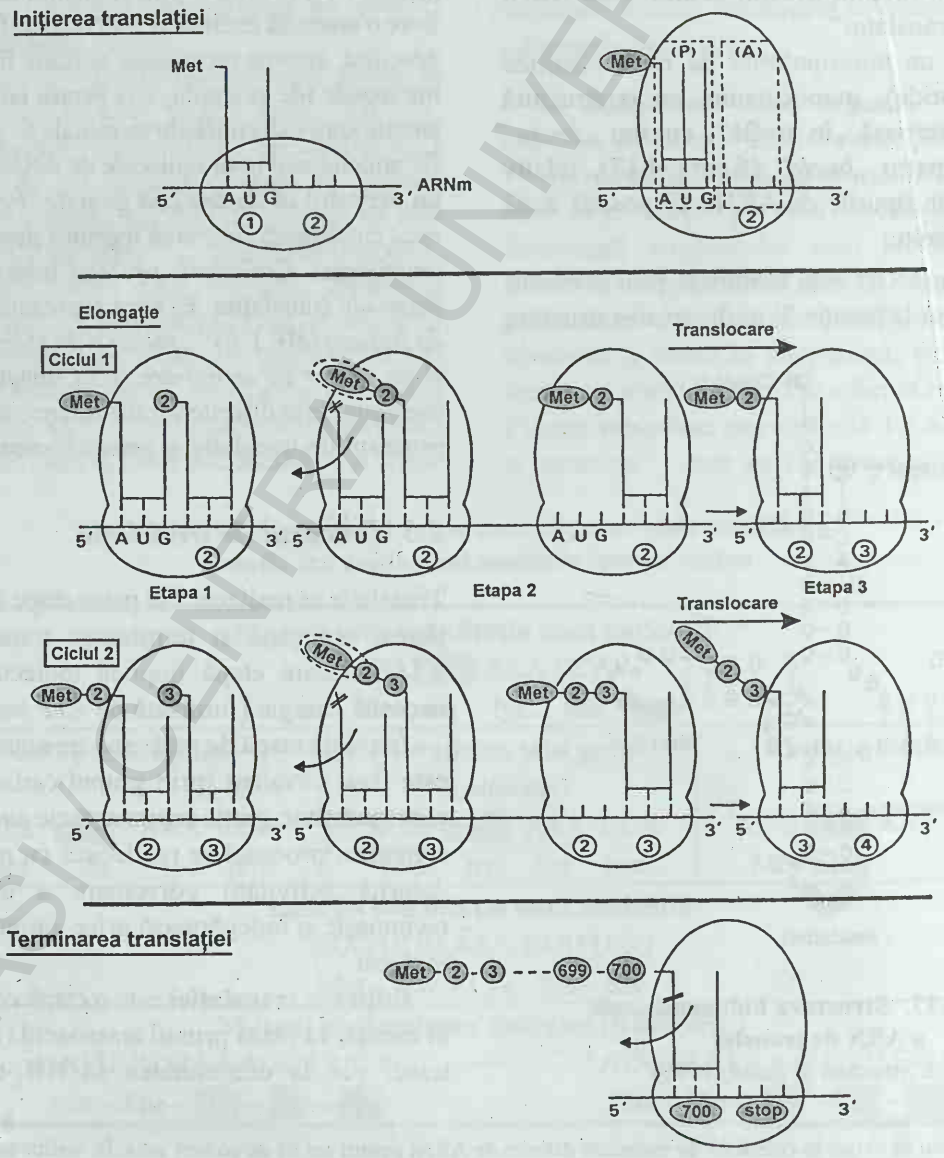


Figura 4.18. Etapele procesului de translație

25. eIF3 se fixează la subunitatea mică a ribozomului și interacționează cu eIF4E fixat la capătul 5' al ARNm, pe calotă.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

nucleotide în lungul ARNm, în direcția 5'→3'. Astfel, ARNt-1 este scos din situsul P (în situsul E), care va fi ocupat de ARNt-2, ce poartă dipeptidul. În situsul A, eliberat, se fixează ARNt-3 cu AA-3 și, printr-o nouă legătură peptidică, AA-3 este fixat la dipeptid.

Ciclul celor trei faze (atașarea AA~ARNt la ribozom, formarea legăturii peptidice, translocarea ribozomului) se repetă și, astfel, catena polipeptidică crește la fiecare ciclu cu un aminoacid. De subliniat faptul că, pe măsură ce un ribozom avansează în lungul catenei de mARN, alți ribozomi pot începe „lectura" acestei catene formându-se astfel sute sau mii de molecule proteice identice („*amplificare*"). Acest proces este favorizat de *circularizarea ARNm,* (determinată de proteinele PABP fixate pe coada poliadenilică a ARNm care se atașează la eIF4 fixate la 5' cap a ARNm), care poate fi astfel tradus fără să fie nevoie o nouă inițiere.

Desigur, în procesul de sinteză a polipeptidului se pot produce erori, dar ele sunt corectate prin diferite mecanisme, ce implică diferite enzime și factori de elongație.

Terminarea. Elongația polipeptidului *se oprește* când ribozomul ajunge la un codon stop, situsul de terminare a translației.

În acest moment, se produce dezasamblarea complexului ribozom-ARNm-polipeptid (prin intervenția unui factor proteic, RF) și polipeptidul este eliberat din ribozom. Ribozomul poate fi reciclat pentru o nouă sinteză, iar polipeptidul suferă o serie de modificări post-translaționale și capătă forma tridimensională specifică.

3. Dirijarea proteinelor nou-sintetizate spre locul de destinație

Fiecare proteină, sintetizată pe baza informațiilor unei gene, funcționează într-un anumit compartiment celular; de exemplu, tubulina – în citosol; histonele – în nucleu; succinat coenzima A reductaza – în mitocondrii; glicozil-transferazele – în aparatul Golgi; receptorii hormonilor peptidici – pe membrana celulară; colagenul – în spațiul extracelular etc. Orice proteină cu o localizare specială posedă una sau mai multe „*secvențe-semnal*" care vor determina, ca un veritabil „cod poștal", adresa sa de destinație[26].

O primă sortare a polipeptidelor nou-sintetizate separă proteinele care vor rămâne în interiorul celulei de cele care vor fi „exportate"/excretate la exteriorul ei. Această decizie inițială este determinată de prezența unei secvențe hidrofobe de 15-30 aminoacizi, situată deobicei la capătul N terminal al proteinelor care vor fi excretate, secvență numită **semnal peptidic** („*peptid signal*"), care lipsește la proteinele cu destinație intracitoplasmatică. După ce s-au încorporat circa 70 de aminoacizi din proteină excretată, secvența-semnal devine „vizibilă" din canalul ribozomic și pe ea se fixează o particulă nucleo-proteică numită **SRP** („*Signal Recognition Particule*")[27], care oprește translația. Complexul *SRP – semnal peptidic* recunoaște și se fixează pe un *receptor* („docking protein") situat pe suprafața citosolică a reticulului endoplasmic (RE) (figura 4.19). După fixare, semnalul peptidic traversează membrana RE, iar ribozomii ce efectuează translația

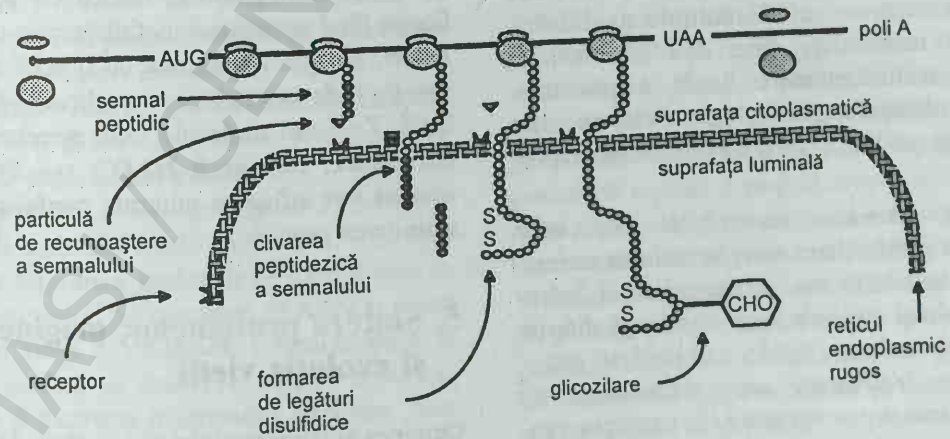


Figura 4.19. Dirijarea proteinelor nou-sintetizate, cu destinație extracelulară, în interiorul reticulului endoplasmic
(modificat după Barsh și Epstein, 1996)

26. Pentru descifrarea mecanismelor prin care se face transportul proteic în diferite localizări celulare Günter Blobel a fost recompensat în 1999 cu Premiul Nobel.
27. SRP este alcătuită din 6 proteine și o mică moleculă de ARN 7SL.

BCU IAȘI CENTRALA LIBRARY

se fixează la RE; apoi, particula SRP este eliberată şi translaţia se reia, dar polipeptidul sintetizat este dirijat în lumenul RE (unde secvenţa peptidică ce „şi-a făcut datoria" a fost deja clivată), fiind apoi transportat la exteriorul celulei.

Printr-un mecanism asemănător, se realizează transportul proteinelor nucleare (cu ajutorul secvenţei semnal NLS (*„nuclear localisation signal"*) şi altor proteine: importine, nucleoporine sau mitocondriale ori al celor destinate aparatului Golgi. În cazul proteinelor lizozomale şi membranare mecanismele sunt diferite. Proteinele (proteazele) destinate lizozomilor au o secvenţă de aminoacizi care determină adiţia post-translaţională a *manozei-6-fosfat*, această modificare determinând dirijarea acestor glicoproteine din RE sau aparatul Golgi în interiorul lizozomilor. Dacă, accidental, modificarea nu se produce, transportul proteazelor lizozomale neprocesate va fi anormal (în mucolipidoze şi boala celulei I). Proteinele ataşate la membrană se fixează prin secvenţe peptidice şi SRP la un receptor din vecinătatea unui por membranar; ele încep să traverseze membrana prin acest por, până când se ajunge la o secvenţă ce opreşte transferul şi determină inserţia proteinei în pătura lipidică a membranei.

Erorile de dirijare a proteinelor sintetizate spre compartimentele corespunzătoare (datorită mutaţiilor ce afectează semnalele de localizare) pot genera diferite boli genetice.

4. Modificările proteinelor după sinteză

În cursul sintezei sau imediat după aceea, catena primară a proteinelor suferă multiple modificări, calitative şi cantitative, care dau structura şi conformaţia tridimensională finală a proteinei, necesară îndeplinirii funcţiile biologice. Cele mai multe proteine suferă modificări post-translaţionale, reprezentate de:

- *modificări chimice (reversibile) ale unor aminoacizi* (fosforilarea sau glicozilarea serinei/treoninei; acetilarea sau metilarea lizinei, hidroxilarea prolinei etc) prin care se adaugă diferite grupe funcţionale sau lipide, carbohidraţi etc;
- *îndepărtarea (clivarea) unor aminoacizi* sau *scindarea unui precursor mare* (de exemplu, pro-opiomelanocortina) în mai multe polipeptide funcţionale; prin acest proces (definitiv) de maturare se formează multe proteine plasmatice, hormoni polipeptidici, neuropeptide, factori de creştere etc.

Numeroase proteine sunt sintetizate sub forma unui precursor *inactiv* (pro-hormon, pro-ferment) care nu poate acţiona asupra substratului; după sinteză, precursorul este clivat proteolitic şi rezultă o proteină matură, activă funcţional. Un exemplu sugestiv este reprezentat de sinteza insulinei: din *proinsulină* cu 86 AA se formează prin clivare catena beta (30 aminoacizi), peptidul C (de conexiune) (35 aminoacizi) şi catena alfa (21 aminoacizi) (figura 4.20).

La aceste modificări chimice se adaugă *modificări conformaţionale*, prin plierea catenei polipeptidice şi formarea unor *structuri secundare* (α-elice, în proteinele fibrilare sau β-pliere, în proteinele globulare) (figura 4.6), prin interacţiuni (punţi de hidrogen, punţi disulfidice) între diferiţi aminoacizi învecinaţi sau situaţi mai la distanţă. Prin aceste modificări conformaţionale, stabilizate prin formarea de legături covalente datorate punţilor disulfidice, proteinele sunt protejate (devin insensibile) de atacul unor proteaze şi iau configuraţia spaţială, tridimensională, specifică, ce le determină activitatea.

Structura tridimensională a proteinelor este rezultatul interacţiunilor fizice care se stabilesc între aminoacizii constituienţi. Cu toate acestea, s-a constatat că plierea iniţială a moleculelor proteice este un proces mediat de o serie de proteine numite **„chaperones"** (Hsp60, Hsp70 şi Hsp90). Ele se cuplează la nivelul lanţului polipeptidic în curs de formare şi previn mai întâi iniţierea plierii extremităţii N-terminale până când întregul proces de translaţie este finalizat. De asemenea, proteinele *chaperones* au un rol important în cazul proteinelor care trebuie transportate în diferite compartimente celulare, precum mitocondriile sau reticulul endoplasmatic, prevenind plierea acestora până la atingerea destinaţiei.

Proteinele pot fi compuse din unul sau mai multe polipeptide (formând o proteină multimerică, ca de exemplu, hemoglobina, fibrele de colagen etc.), fiecare fiind supusă unor modificări post-translaţionale. Astfel, ele pot intracţiona cu o serie de *cofactori specifici* (de exemplu, cationi bivalenţi Ca^{+2}, Fe^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2} sau molecule mici necesare activităţii enzimatice, cum ar fi NAD^{+}) sau *liganzi*. Toate acestea vor influenţa puternic conformaţia şi deci activitatea proteinei.

5. Sinteza proteinelor, originea şi evoluţia vieţii

Originea acizilor nucleici şi a proteinelor, a codului genetic, a aparatului şi mecanismului de translaţie sunt probleme interesante şi actuale, deoarece ele reprezintă, în esenţă, *substratul biochimic al originii vieţii*. Faptele certe sunt puţine, iar ipotezele numeroase şi divergente. Dogma centrală a geneticii: **ADN → ARN → proteine** implică existenţa unor *molecule informaţionale*, dar şi a unor *proteine*

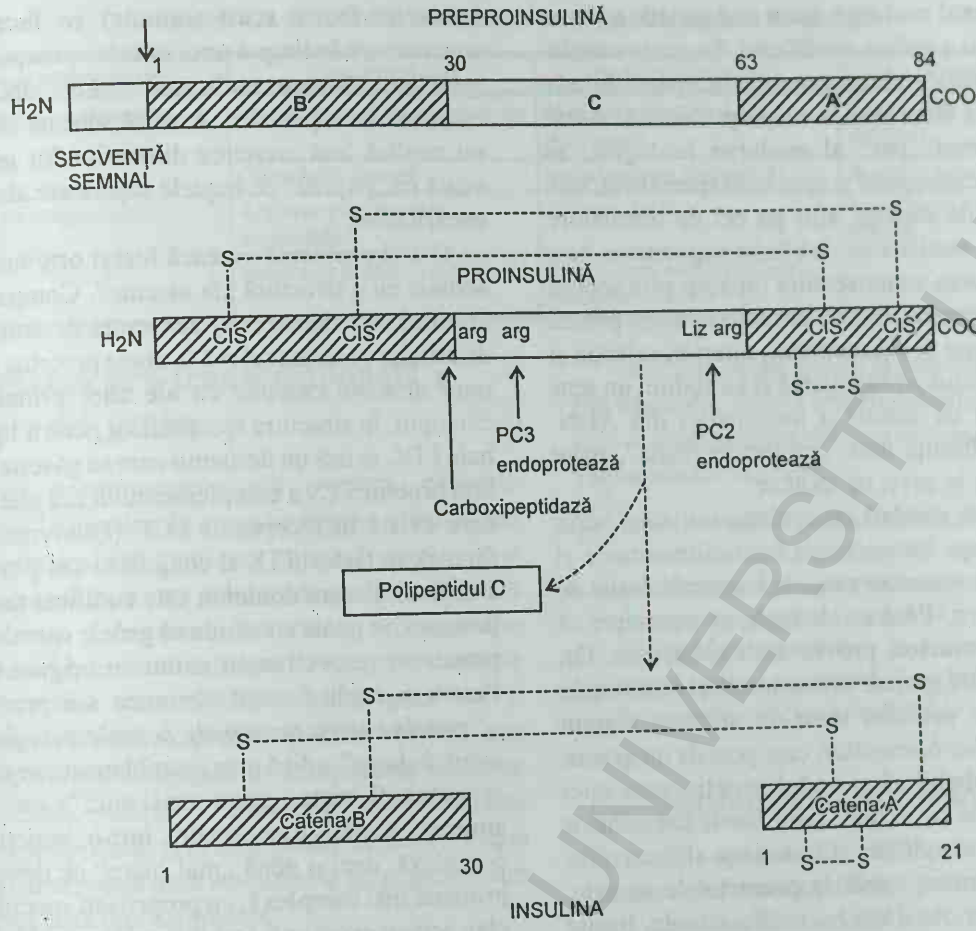


Figura 4.20. Sinteza insulinei implică multiple clivări posttranslaționale ale precursorului polipeptidic

catalitice care să realizeze diferitele etape ale transferului informației genetice. Se pune firesc întrebarea: *cine a apărut mai întâi pe Pământ, proteinele sau acizii nucleici*? Dacă se acordă prioritate acizilor nucleici, atunci nimeni nu poate răspunde la întrebarea: cum a fost posibilă replicarea, transcripția sau translația acizilor nucleici în absența unor proteine catalitice? Astfel, la nivel molecular, clasica dilemă „oul sau găina" se traduce printr-o nouă dilemă „acizii nucleici sau proteinele".

ADN nu poate fi „*molecula originară*" deoarece este lipsită de activități catalitice. Recent, s-au descoperit însă **ribozimele**, molecule de ARN dotate cu activitate catalitică și s-a presupus că ARN ar putea fi în același timp o moleculă informațională și enzimatică, putând să realizeze singură stocarea, conservarea și expresia informației ereditare. S-ar putea deci prezuma că viața a început „în supa prebiotică" prin formarea spontană a moleculelor de ARN, aminoacizi și polipeptide care, acționând în simbioză, ar fi realizat complexe ribonucleoproteice capabile de „proliferare și perenizare". Foarte probabil, primele forme de viață apărute pe pământ s-au bazat pe ARN cu funcții auto-catalitice, care ulterior au trecut „sarcina" stocării de informație la ADN bicatenar, mult mai stabil, iar funcțiile enzimatice au fost transferate proteinelor, mai „abile". Multă vreme s-a crezut că ARN era un simplu intermediar („*moleculă accesorie*") între ADN și proteine, dar descoperirile recente (vezi subcapitolul 3.C.3.3) schimbă această ipoteză sugerând că *ARN a continuat să evolueze*, perfecționându-și rapid capacitățile structurale și informative/reglatoare pentru a îndeplini roluri multiple și variate, prin interacțiune cu ADN și proteinele. Argumentul final este faptul că *evoluția genomică rapidă a dus la creșterea cantității de ADN intergenic* și transcrierea lui masivă în ARN, concomitent cu creșterea complexității organismelor. Viziunea genomului în care informația genetică și programul genetic sunt centrate pe proteine pare greșită; majoritatea informației genetice este încorporată în ARN necodant și dogma centrală a geneticii „pare imperfectă". A sosit probabil timpul ca să vedem *genomul uman mai mult ca o „mașină de ARN" decât ca o „mașină de proteine"*.

Caracterul universal al codului genetic permite ipoteza logică că toate organismele vii au avut un *strămoș comun*, numit și LUCA, acronimul englez al termenului „*last universal common ancestor*". El avea un cod genetic deja „elaborat", identic cu cel

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

actual; în cursul evoluției, acest cod genetic a rămas „înghețat", nu a suferit modificări. Se poate concluziona că apariția codului genetic și a aparatului său traducător s-a făcut deci în etapa prebiotică. Acizii nucleici, primul „pas" al evoluției biologice, au apărut pe cale *abiogenă* și apoi s-au specializat, unii jucând rolul de matriță, alții pe cel de translatori. Astfel, acizii nucleici au dobândit capacitatea de a dirija asamblarea aminoacizilor (apăruți prin același mecanism abiogen). Inițial, ei realizau acest proces în mod ambiguu și bidirecțional; ulterior, selecția și evoluția au exclus ambiguitatea și au stabilit un sens unidirecțional de lectură a informației din ADN. Evident, în absența unor „molecule fosile", toate acestea rămân la nivel de ipoteze.

O problemă, corelată cu evoluția inițială a lumii vii, este *absența intronilor* la bacteriile actuale și prezența lor la eucariote sau... la bacteriile fosile de tip arheobacterii. Până nu de mult, se considera că organismele eucariote provin dintr-o bacterie. Or, această idee pare greșită: procariotele și eucariotele actuale provin probabil dintr-un strămoș comun asemănător *arheobacteriilor*, care poseda un genom cu introni. Probabil că și codul genetic avea mici diferențe față de cel actual, fiind foarte asemănător cu cel al mitocondriilor. Evoluția s-a făcut prin pierderea intronilor, totală la procariotele actuale, parțială la eucariote. Deci bacteriile actuale, lipsite de introni ar fi... *punctul maxim al evoluției* (!!) deoarece utilizarea ADN este mai performantă decât la eucariote. Explicația s-ar putea baza pe timpul de înmulțire foarte scurt (minute) ce face posibilă succesiunea în timp a unui număr aproape infinit de generații, oricum mult mai mare decât cel al eucariotelor superioare. Această schemă seducătoare nu explică însă creșterea dimensiunilor genomului, odată cu „păşirea" pe treptele superioare ale evoluției eucariotelor.

O altă problemă vizează însăși originea genelor actuale cu o structură „*în mozaic*". Compararea (cu ajutorul calculatoarelor) secvenței de aminoacizi a diferitelor proteine relevă la unele proteine existența unor *domenii comune* cu ale altor proteine. Spre exemplu, în structura receptorilor pentru lipoproteinele LDL există un domeniu care se găsește în structura proteinei C9 a complementului sau alte domenii care există în receptorul EGF (*epidermal growth factor*), în factorul IX al coagulării sau proteinei C. Deoarece fiecare domeniu este codificat de un grup de exoni, se poate conchide că genele care determină proteinele respective au exoni cu origine comună. Pentru a explica acest fenomen s-a presupus că „*...genele pentru proteinele actuale s-au format ca jocul de Lego*", adică prin asamblarea unor exoni (ce ar putea fi niște „gene mai mici") ce codifică anumite unități funcționale, într-o structură mai complexă, deci o genă „mai mare" ce determină o proteină mai complexă, cu proprietăți specifice; mai clar, aceiași exoni ar fi fost folosiți în asamblarea unor gene diferite. Intronii prezenți încă de la primele bacterii ancestrale ar fi, în această concepție, „fragmente de gene nefuncționale".

D. Reglarea expresiei genelor

Celulele corpului uman, indiferent de structura și funcția lor, posedă aceeași informație genetică, deoarece rezultă prin mitoze succesive din același zigot. Ceea ce determină însă individualitatea fiecărei celule sau tip celular este expresia genică diferită. Genele comune sunt *exprimate continuu*, în toate tipurile celulare, deoarece produșii lor proteici sunt necesari permanent pentru întreținerea celulei (sinteze proteice, producere de energie etc.). Multe alte gene au însă o *expresie limitată*, iar altele sunt complet și *permanent inactivate* în celule sau țesuturi specifice. În plus, expresia genelor „autorizate" să se exprime prezintă o *limitare spațială* (pentru anumite organe, țesuturi, celule) și *temporală* (stadii diferite ale dezvoltării sau ciclului celular), fiind *adaptată* la natura și intensitatea stimulilor extracelulari. Toate aceste fenomene presupun intervenția unor mecanisme complexe de control a expresiei genice.

Mecanismele de reglare a expresiei genelor au fost descifrate inițial la procariote punând în evidență celebrul „*model al operonului*" descris în 1961 de către François Jacob și Jacque Monod la *E. coli* (Premiul Nobel, 1965). Aceste mecanisme sunt relativ simple și bazate în special pe reglarea transcripțională. Ele nu se aplică direct la eucariote, și deci la om, pentru două motive esențiale: genomul uman nuclear este *enorm* (comparativ cu cel al bacteriilor) și puternic *compactat* în fibrele de cromatină din nucleul interfazic. La eucariote funcționează *multiple mecanisme de reglaj* ce acționează *în fiecare etapă a exprimării genelor*, de la nivelul cel mai înalt al reglării structurii cromatinei până la ultimul nivel posibil, reglarea post-translațională. Mecanismele de reglare sunt adesea *înlănțuite și arborescente* (rețele de reglare), reducând considerabil efortul de selecție a unor gene ce trebuie exprimate și permițând o ajustare a vitezei și intensității reacției la diferiți stimuli.

Tabel 4.3. Niveluri și mecanisme de reglare a sintezei de proteine

Pre-transcripțional	Transcripțional	Post-transcripțional	Translațional
Modificări în conformația ADN	Elemente *cis* și *trans* reglatoare	Matisarea alternativă sau diferențiată	Interferența ARN (rolul ARNmi)
	Controlul la distanță	Poliadenilarea alternativă	Reglarea prin factori externi
Modificări epigenetice	Reglarea prin semnale extracelulare	Editarea ARN	Localizarea intracelulară a ARNm
	Selectarea promotorilor	Modificarea stabilității sau stocajului ARNm	

1. Reglarea pre-transcripțională a expresiei genice

Reglarea pre-transcripțională vizează expresia *„spațială"* a genelor, în *anumite* organe, țesuturi sau tipuri celulare. Diferențierea celulară presupune *o triere a genelor* pe care celula este „autorizată" să le transcrie și *plasarea lor într-o configurație „deschisă" a cromatinei*, care le va permite să fie mai accesibile transcripției; celelalte gene vor fi represate. Această expresie specific tisulară sau celulară trebuie *menținută* în descendența celulelor specializate. Ambele fenomene sunt realizate pre-transcripțional prin *modificări în conformația ADN* și intervenția unor *mecanisme epigenetice* care modifică structura cromatinei.

1.1. Modificări în conformația ADN

Structura ADN poate suferi o serie de modificări conformaționale care influențează interacțiunea dintre anumite secvențe ale ADN și diferite molecule exogene reglatoare. Variațiile gradului de torsiune a ADN (de exemplu, **supraînrularea ADN**, controlată de *topoizomeraze*) sunt folosite pentru a modifica accesul proteinelor implicate în transcripție la promotorul genelor. Trecerea de la forma B a ADN unor gene la **forma Z** (vezi subcapitolul 2.B.2) este importantă pentru reglarea activității genice, deoarece ar face secvențele ADN mult mai accesibile la factorii de transcripție.

Au fost identificate și alte variații de la forma elicoidală clasică a ADN. Astfel, în regiunile bogate în guanină (G) (de exemplu, promotorul unor protooncogene) se produce o structură a ADN pliată de patru ori, numită **quadruplex-G** sau tetradă-G), care blochează transcripția lor. Mutațiile care determină abolirea acestor structuri au drept consecință activarea acestor oncogene și participă la producerea multor forme de cancer.

În sfârșit, există situații în care expresia unor gene (de exemplu, pentru imunoglobuline) este asociată cu o reconfigurare a regiunii genomice produsă prin **recombinări somatice**.

Genele ce codifică partea variabilă a imunoglobulinelor sunt situate la distanță de cele care codifică partea constantă; în celulele producătoare de anticorpi, o genă pentru regiunea variabilă va fi adusă – prin recombinare somatică – în vecinătatea altei gene pentru regiunea constantă, formând o singură unitate transcripțională (vezi capitolul 17).

1.2. Mecanismele epigenetice

Termenul **epigenetică** definește modificări ale complexului nucleoproteic ce formează cromatina care *nu implică modificări în secvența* lor nucleotidică (epi – *„pe lângă, în plus față de"*) dar care influențează expresia spațială și/sau temporală a genelor Aceste modificări, produse sub acțiunea unor anumite proteine sau molecule de ARNnc ori ca răspuns la acțiunea unor factori de mediu, pot fi *transmisibile* atunci când celula se divide[28], „păstrându-se" în celulele descendente, grație unei veritabile *„memorii epigenetice celulare"*. Totuși, modificările epigenetice pot fi *reversibile*[29] în anumite condiții, fapt care le face extrem de utile în reglarea expresiei genice.

Asemănarea dintre genetică și epigenetică a generat multipli termeni paraleli:

- **epigenom** – starea epigenetică globală și particulară a unei celule; toate celulele corpului au același genom, dar fiecare tip celular are un anumit epigenom;
- **cod epigenetic** – un set particular de modificări epigenetice combinate (modificări specifice ale histonelor, definite prin *codul histonic*, asociate cu un anumit model de metilare a ADN) care determină fenotipuri diferite în celule diferite; în timp ce codul genetic este același în toate celulele, codul epigenetic este specific celulelor și țesuturilor

28. Uneori, modificările epigenetice se transmit prin gameți, de la părinți la descendenți (sub forma unor *„paramutații"*).
29. O dovadă spectaculoasă a reversibilității a fost adusă de experiențele de transferare a nucleului unei celule somatice diferențiate într-un ovul enucleat care generează un întreg organism, o clonă.

(„codul genetic este *pianul* iar codul epigenetic este *melodia*");

- **epimutații** - modificări în structura epigenetică a celulei; ele par mai frecvente decât mutațiile clasice (ale secvenței ADN).

În nucleii celulelor, moleculele de ADN formează împreună cu histonele structuri compacte sub forma nucleozomilor și fibrelor de cromatină (vezi subcapitolul 2.C.2.3). Activarea sau represia unor gene în anumite celule și țesuturi implică, în primul rând, *remodelarea structurii locale a cromatinei* care va lua o *configurație deschisă*, ce va permite accesul factorilor de transcripție și ARN polimerazei la promotorul genelor și activarea transcripției, sau „*o configurație închisă*", care va bloca transcripția. Aceste modificări în structura cromatinei se realizează prin mecanisme epigenetice, multiple și interactive. Reglarea epigenetică este inițiată prin *modificări (post-translaționale) ale structurii histonelor nucleozomale*, care influențează interacțiunile dintre ADN și histone (le scad, în cazul activării transcripției, sau le cresc, în cazul represiei). Aceste fenomene nu sunt suficiente, fiind urmate de *repoziționarea nucleozomilor* și *metilarea ADN*. Toate aceste modificări epigenetice sunt inițiate, menținute și integrate prin intervenția unor proteine specifice și a unor molecule de ARN necodant (scurt sau lung).

Modificările epigenetice reprezintă unele dintre fenomenele de bază ale diversității biologice și sunt implicate în mecanismele dezvoltării umane sau îmbătrânirii precum și în patogenia cancerului, bolilor cardiace sau mentale.

1.2.1. Modificări epigenetice

a) Modificări ale histonelor nucleozomale

Modificările unor aminoacizi din structura histonelor nucleozomale (mai frecvent H3 și H4) au rol important în reglarea expresiei genice și reprezintă un marker epigenetic esențial.

Modificările histonelor sunt *variate*, unele mai frecvente (acetilarea/dezacetilarea, metilarea/demetilarea), altele mai rare (fosforilare, ubiquitinare, sumoilare, ADP ribozilare, deiminare și prolil-izomerizare). Ele sunt produse de *enzime specifice* procesului: histon-acetiltransferaze (HAT) sau histon-dezacetilaze (HDAC), histon-metiltransferaze (DNMT) sau histon-demetilaze etc. Aceste modificări interesează specific anumiți aminoacizi – mai ales lizina (K)[30] și arginina (R) – ce ocupă anumite poziții în „*cozile amino-terminale*" ale histonelor nucleozomale, producând activarea sau represia transcripției.

Unele modificări ale histonelor[31] sunt corelate cu activarea transcripției, iar altele cu represia ei. **Acetilarea histonelor** implică exclusiv reziduurile de lizină din extremitatea amino-terminală, mai ales în H3 și H4, fiind asociată cu *activarea transcripției*; dezacetilarea lor produce represia transcripției. **Metilarea histonelor** interesează reziduurile de lizină sau arginină și are efecte diferite, dependente de *poziția aminoacidului*: de exemplu, metilarea lizinelor din pozițiile 4, 36 și 79 ale histonei H3 este asociată cu *activarea* transcripției, în timp ce metilarea lizinelor 9, 20 și 27 este asociată cu *represia* transcripției.

Mecanismele prin care modificarea histonelor produc activarea sau represia transcripției sunt în primul rând de natură biofizică: acetilarea sau metilarea histonelor modifică (diferit) *interacțiunile* dintre ADN și miezul nucleozomului sau dintre doi nucleozomi vecini, producând *relaxarea sau compactarea structurii cromatinei*. În al doilea rând, diversele modificări histonice acționează ca *situsuri de semnalizare și recrutare (legare)* pentru o varietate largă de *proteine nonhistonice de remodelare*, care modifică activ conformația cromatinei (vezi mai jos).

Important de subliniat este faptul că aceste modificări histonice *nu se fac la întâmplare*, ele produc un veritabil **cod al histonelor**, reprezentat de o *combinație particulară de modificări*, ce determină în ultimă instanță conformația cromatinei și reglarea transcripției ADN dintr-o anumită regiune. Astfel, acetilarea lizinelor H3K9 sau H3K14 și metilarea H3K4 sau H3K79 determină activarea transcripției, în timp ce metilarea lizinei H3K9 produce represia, fiind asociată heterocromatinei constitutive. Codul histonelor împreună cu alte modificări (modelul metilării ADN, vezi mai jos) ar constitui **codul epigenetic**, caracteristic fiecărui tip celular.

b) Remodelarea cromatinei prin schimbarea poziției nucleozomilor

Modificările histonelor nu sunt suficiente pentru o modificare consistentă a transcripției, pentru aceasta fiind necesare și alte mecanisme. Un rol important îl are remodelarea cromatinei prin *repoziționarea nucleozomilor*. Acesta este un proces activ, ce necesită energie eliberată prin hidroliza ATP, fiind realizat de către o serie de proteine din componența **complexelor de remodelare a cromatinei**.

30. Literele majuscule dintre paranteze sunt abrevierile internaționale pentru aminoacizi.
31. Notarea prescurtată a modificărilor histonice se face după o nomenclatură standardizată: tipul de histonă – abrevierea aminoacidului implicat (vezi tabelul 4.1) – poziția acestui aminoacid în regiune amino-terminală a histonei – modificarea. De exemplu, H4K12ac semnifică acetilarea lizinei (K) din poziția 12 a histonei H4, iar H3K4me3 semnifică trimetilarea lizinei 4 a histonei H3.

Ele sunt alcătuite din proteine multiple ce includ obligatoriu *o helicază* dependentă de ATP, „motorul" ce realizează modificarea structurii cromatinei prin *deplasarea nucleozomilor* pe o scurtă regiune a ADN, unde se vor fixa factorii de transcripție.

Complexele de remodelare conțin proteine ce prezintă domenii speciale care *recunosc modificările specifice ale histonelor*: unele, numite *bromodomenii*, recunosc lizinele acetilate (de exemplu, **complexul SW1/SNF**), altele, numite *cromodomenii*, recunosc lizinele metilate (de exemplu, **proteina HP1**), iar *domeniile PHD* („*plant homeodomain*") interacționează într-un mod mai general cu cromatina. Multe dintre proteinele de remodelare conțin câteva asemenea bromodomenii sau cromodomenii funcționale, ceea ce le permit „*citirea*" *concomitentă* a mai multor modificări histonice, într-o modalitate combinatorie. Complexele de remodelare pot de asemenea media încorporarea unor **variante histonice** (H2A.Z și H3.3) în nucleozomi, care fiind mai instabile favorizează depleția de nucleozomi în promotor.

c) Metilarea ADN

Metilarea ADN este un marker epigenetic esențial pentru reglarea expresiei genice, producând de regulă *represia transcripției*. La om, metilarea ADN are loc aproape exclusiv în poziția 5' a citozinei[32] din cadrul *dinucleotidelor CpG* (litera *p* desemnează aici legătura fosfodiester ce există între C și G de pe aceeași catenă a ADN). Circa 70-80% din totalul dinucleotidelor CpG din genomul uman[33] sunt metilate (mai ales în secvențele repetitive ale transpozonilor, suprimând mobilitatea lor). Dinucleotidele *CpG nemetilate* se găsesc concentrate în anumite regiuni, denumite **insule CpG**, localizate foarte adesea în promotorul majorității genelor, precum și în interiorul unor gene amprentate (vezi mai jos). Metilarea citozinei din insulele CpG produce o *represie a transcripției*.

Metilarea ADN este stabilită și menținută prin acțiunea unor *ADN-metiltransferaze* și a unor proteine asociate și este îndepărtată prin intervenția unor *ADN-demetilaze*. Efectul metilării ADN asupra expresiei genice poate fi *direct*, în sensul că unii factori de transcripție nu se pot lega la secvențele țintă cu ADN metilat, sau, cel mai adesea, *mediat* prin acțiunea unor proteine specifice cu domeniu **MBD** (*Methyl--cytosine-Binding Domain*), care au capacitatea de a recunoaște și de a se lega specific la grupările metil atașate citozinei, producând represia transcripției.

Au fost identificate două clase importante de **ADN--metiltransferaze**: DNMT1 este *metiltransferaza de menținere*, care metilează dinucleotidele *CpG* din catenele ADN nou formate în cursul procesului de replicare a ADN; funcția sa este esențială în *menținerea* modelului de metilare a ADN în succesiunea generațiilor de celule (DNMT1 recunoaște citozinele metilate de pe catena matriță și produce metilarea corespunzătoare a citozinelor în catena nou formată) (figura 4.21). DNMT3A și DNMT3B sunt metiltransferaze *de novo*[34], implicate în stabilirea *modelului nou* de metilare a ADN în diversele etape ale dezvoltării. DNMT1 și DNMT3A interacționează cu histon-dezacetilazele (HDAC) și, împreună, pot accentua represia transcripției. Existența unor **ADN-demetilaze** a fost pentru multă vreme controversată. Date recente sugerează însă destul de convingător existența potențială a două căi alternative de demetilare a ADN.

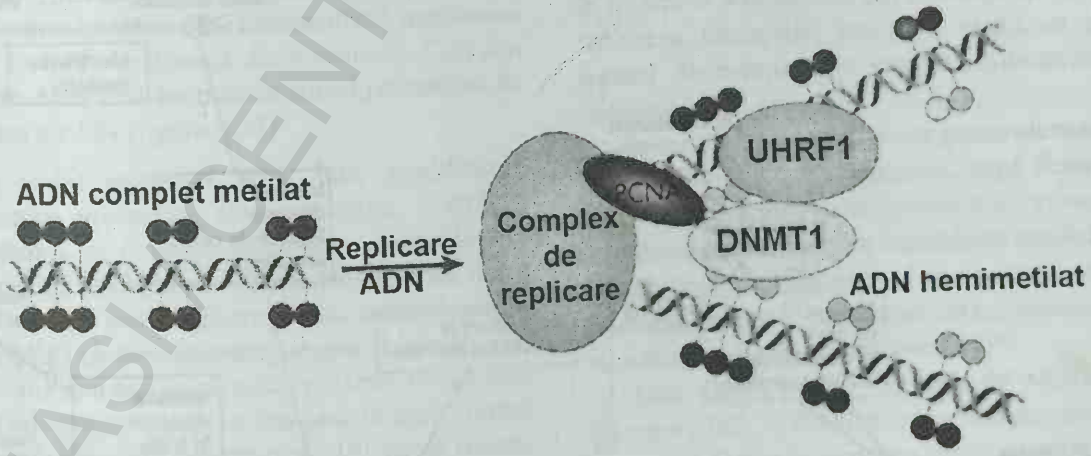


Figura 4.21. Menținerea metilării ADN în cursul replicării sale
(modificat după Law și Jacobsen, 2010)

32. Gruparea metil este poziționată în incizura mare a dublului helix ADN. Ca urmare, ea nu afectează împerecherea normală cu guanina de pe catena complementară, în schimb prezența sa este recunoscută de către proteine specifice cu domeniu MBD.
33. Dinucleotidele CpG sunt mult mai rare decât alte dinucleotidele datorită tendinței citozinei metilate de a fi dezaminată în timină.
34. A fost identificată o a patra proteină, DNMT3L care este importantă pentru asigurarea metilării *de novo* corecte a secvențelor ADN corespunzătoare.

BCU IAȘI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

Proteinele cu domeniu MBD, reprezentate la om de cinci membri: MBD1-4 şi MECP2, recunosc grupările metil ataşate citozinei şi se leagă la aceste grupări, accentuând represia ADN.

* * *

Cunoaşterea modificărilor epigenetice este departe de a fi încheiată, dar consecinţele practice încep să se întrevadă. Vom menţiona două aspecte.

- O serie de gene pentru proteine implicate în modificarea histonelor, remodelarea cromatinei sau metilarea ADN au fost identificate recent a fi ţinta mutaţiilor care produc unele *boli genetice*. Alterarea modificărilor epigenetice este frecventă în *cancer* şi poate fi prezentă şi în anumite *boli multifactoriale*.
- O caracteristică a modificărilor epigenetice amintite este *potenţialul lor reversibil*, ceea ce a condus la posibilitatea dezvoltării unor noi ţinte terapeutice în diverse boli (inclusiv cancerul) în care aceste mecanisme de reglare epigenetică sunt perturbate. Aşa sunt *azacitidina* şi *decitabina*, inhibitori ai metilării ADN sau acidul *hidroxamic*, inhibitor al histon-deacetilazelor (HDAC).

1.2.2. Mecanisme de iniţiere, menţinere şi integrare a modificărilor epigenetice

Metilarea ADN asociată cu dezacetilarea histonelor reprezintă mecanismul principal de represie a transcripţiei, ce poate fi considerată *„o poziţie standard"* normală a genomului uman. Ea este iniţiată în cursul dezvoltării embrionare, prin *reprogramarea metilării* urmată de *activarea genele exprimate specific tisular* (ce trebuie să fie demetilate, cel puţin în regiunea promotor).

a). Iniţierea modificărilor epigenetice

O primă etapă de reprogramare a metilării are loc imediat după momentul fertilizării, deoarece ovocitul, dar mai ales spermatozoidul au ADN puternic metilat. Chiar înainte de fuziunea pronucleilor din gameţi, pronucleul masculin este subiectul unor procese de *demetilare activă*, mediate probabil de ADN-demetilaza TET1 (Figura 4.22). După fuziunea celor doi pronuclei, genomul zigotului continuă să sufere un proces de *demetilare pasivă* până în stadiul de blastocist precoce, când are loc implantarea embrionului în uterul matern.

Acest proces de *demetilare pasivă* este explicat prin excluderea din nucleu a proteinei DNMT1o (specifică ovocitului) până în stadiul de blastocist. Ca urmare, cu fiecare replicare a ADN, cantitatea de 5-metilcitozină este înjumătăţită. Aceste procese de demetilare sunt implicate în recâştigarea capacităţii *totipotente* a celulelor ce formează embrionul precoce. Câteva regiuni ale genomului sunt însă rezistente la aceste fenomene de demetilare. Printre acestea se numără şi genele amprentate (vezi mai jos) protejate prin intervenţia unor proteine specifice[35].

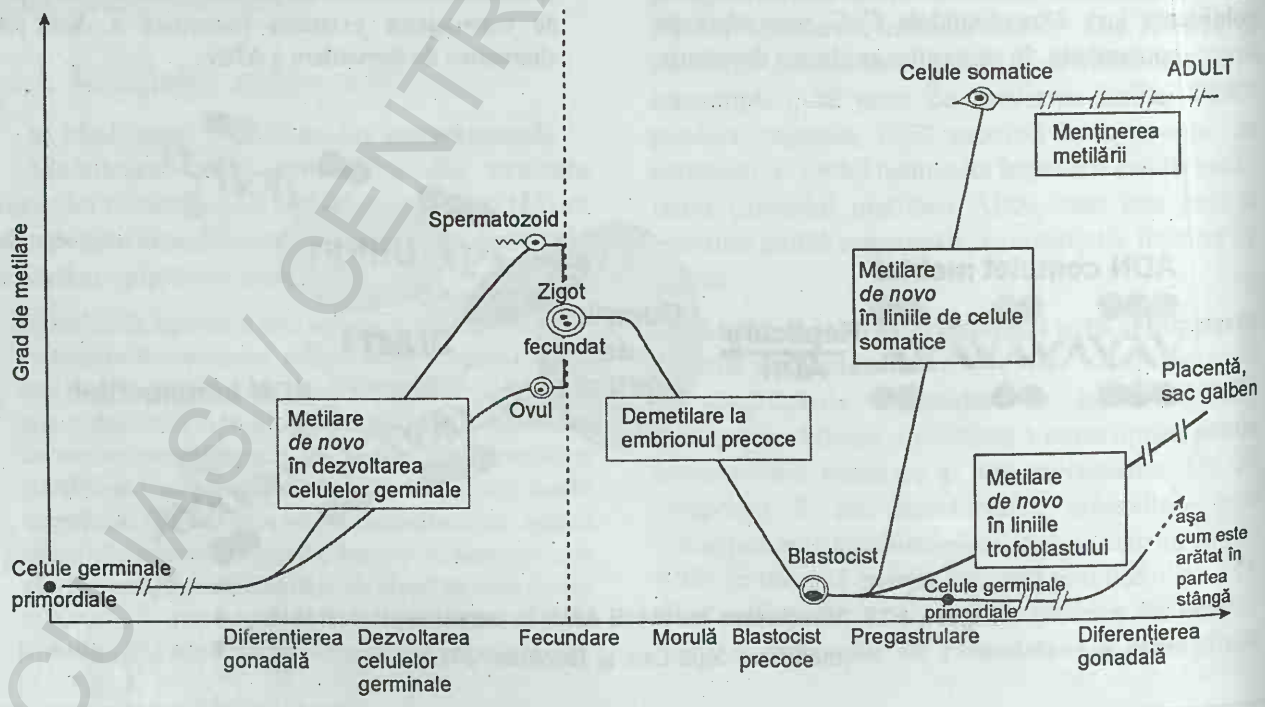


Figura 4.22. Modificări în metilarea ADN în cursul dezvoltării embrionare precoce, la mamifere

(modificat după Strachan şi Read, 2010)

35. ZFP57 sau Stella – care protejează amprentele materne şi MBD3 care protejează cel puţin unele dintre amprentele paterne.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După implantarea embrionului au loc *fenomene de metilare* de novo care sunt asociate cu stabilirea diferitelor linii celulare și, deci, cu diferențierea celulară. Metilarea apare inițial la nivelul celulelor interne ale blastocistului care vor forma ulterior viitorul embrion, în timp ce celulele care formează trofoblastul (din care derivă placenta etc.) rămân hipometilate.

Celulele germinale primordiale suferă *un al doilea val de demetilare ADN* care coincide cu migrarea acestora către creasta genitală (de exemplu, toate ovocitele la femeie au ambii cromozomi X activi). După formarea progonadei, celulele germinale suferă un proces de remetilare, după modele caracteristice fiecărui sex. Un rol important în remetilarea *de novo* în celulele germinale revine **ARNpi** (vezi mai jos).

b) Menținerea modelelor de reglare epigenetică („memoria epigenetică").

Rolul major al metilării ADN în reglarea expresiei genelor nu se reduce la *stabilirea modelului* de metilare/demetilare din cursul embriogenezei, ci și în *menținerea sa* în cursul replicării și generațiilor succesive de celule diferențiate sau *modificarea* sa sub acțiunea semnalelor extracelulare. În aceste procese intervin mai multe mecanisme, mediate de proteine specifice sau ARN necodant.

(1) **Acțiunea metiltransferazelor de menținere.** Funcția esențială a DNMT1 este menținerea modelului de metilare a ADN în cursul replicării. Acționând la nivelul furcii de replicare a ADN, împreună cu PCNA (antigenul nuclear de proliferare celulară) și mai ales proteina UHRF1 (care recunoaște specific dinucleotidele *CpG* hemimetilate), metiltransferaza DNMT1 metilează dinucleotidele *CpG* din catenele ADN nou formate în cursul procesului de replicare a ADN (figura 4.21).

(2) **Rolul proteinei HP1.** Între modificările epigenetice prezentate mai sus există o strânsă interacțiune, ce permite *organizarea cromatinei* în eucromatină sau heterocromatină. De exemplu, lizina H3K9 metilată poate lega proteine cu cromodomeniu precum HP1 (*heterochromatin protein 1*); aceasta este o proteină non-histonică mică, puternic conservată în cursul evoluției, care se asociază în mod normal cu *heterocromatina constitutivă*. HP1 poate recruta ADN metiltransferaze, formând astfel circuite mutuale de accentuare a efectelor de represie ce sunt responsabile de menținerea *pe termen lung* a organizării heterocromatinei constitutive. Proteina HP1 are rol și în *extensia heterocromatinizării* de la un nucleozom la altul, până la nivelul elementelor barieră numite *izolatori* (vezi mai jos).

(3) **Rolul proteinelor din grupul polycomb și grupul trithorax.** Celulele pot lua decizii de dezvoltare ca răspuns la unele *semnale tranzitorii din mediul înconjurător*, însă aceste decizii trebuie să fie menținute („reamintite") de către celulele fiice, la mult timp după ce semnalele inițiale au dispărut. În afara ADN metiltransferazei de menținere DNMT1 au fost identificate două grupuri de proteine conservate în cursul evoluției, care sunt importante pentru inițierea, păstrarea și transmiterea *memoriei epigenetice*: proteinele **polycomb** (PRC1 și PRC2) care au efect *represiv* (induc metilarea lizinei H3K27 la nivelul genelor țintă, în special în gene care codifică factori de transcripție implicați în procesele de dezvoltare) și proteinele **trithorax** care *stimulează* transcripția (funcționând împreună cu proteine de remodelare a cromatinei din familia SWI/SNF, precum și cu histon-metiltransferaze responsabile de metilarea H3K4).

(4) **Rolul moleculelor de ARN necodant.** Două tipuri de **ARNnc scurt** – ARNmi și ARNsi – sunt implicate, prin fenomenul de interferență a ARN (vezi mai jos), în organizarea heterocromatinei în genom prin *complexul RITS* (*RNA-Induced Transcriptional Silencing*) ce participă la metilarea histonelor și ADN, realizând supresia heterocromatinei. Dar, supresia heterocromatinei necesită transcripția elementelor repetitive din cadrul acestor regiuni. Produșii de transcripție care rezultă sunt procesați în molecule **ARNsi** care pot declanșa la rândul lor metilarea histonelor, realizând astfel un proces mutual de menținere a metilării histonelor și a metilării ADN.

În cursul dezvoltării celulelor germinale masculine (și probabil și a celor feminine), după demetilarea ADN la scara întregului genom are loc activarea tranzitorie a transposonilor. Restabilirea metilării ADN și anihilarea efectului nociv al transpozonilor implică intervenția **ARNpi**[36] care recrutează metiltransferazele *de novo* și restabilesc metilarea ADN.

Cele câteva mii de molecule de **ARNnc lung** (precum *XIST*, *HOTAIR* etc.) recent descoperite (vezi și caseta 3.7) sunt de asemenea implicate în numeroase procese epigenetice. Ele pot reprima sau activa expresia a numeroase gene prin efecte atât *in cis*, cât și *in trans*, ca urmare a interacțiunii directe cu diverse complexe de modificare a cromatinei.

36. Denumirea de ARNpi (*Piwi-inteacting RNA*) derivă de la interacțiunea acestui tip de ARN mic cu proteinele piwi, descrise inițial la *Drosophila* și implicate în represia transpozonilor și interferența ARN.

BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

c) Marcarea genelor („*gene bookmarking*")

Recent a fost descris un alt mecanism de menținere/transmitere a modelului epigenetic de expresie genică a unei celule („*memoria celulară*"), prin mitoză la celulele fiice, numit „*gene bookmarking*" – *semn de carte*: anumite gene esențiale pentru funcția celulară (gene ARNr, gene ce controlează proliferarea și diferențierea celulară) sunt „*marcate*" *la nivelul promotorilor* în mod special înaintea mitozei, pentru a menține fenotipul particular al liniei celulare (celulele hepatice se divid în celule hepatice deci „*cartea se deschide la aceeași pagină*").

Printre mecanismele implicate în acest proces sunt: decondensarea locală a cromatinei (prin defosforilarea condensinelor); prezența unor variante histonice; retenția unor factori de transcripție, ce definesc linia celulară, la nivelul promotorilor genelor țintă.

d) Compartimentalizarea nucleară

Fiecare cromozom ocupă un *teritoriu distinct* în interiorul nucleului, care este caracteristic unui anumit tip celular. Genele active tind să fie localizate la suprafața acestor teritorii, în special către centrul nucleului. Genele inactive transcripțional sunt mult mai adesea localizate către periferia nucleului. Multe secvențe localizate la distanță în lungul cromozomilor sau chiar pe cromozomi diferiți *se pot astfel apropia unele de altele* atunci când intervin în procese comune, fenomen descris ca *„sărut" al genelor*.

De exemplu, în celulele stem embrionare de la femeie, cele două centre de inactivare ale cromozomilor X (XIC) vin în contact unul cu altul imediat înainte de declanșarea procesului de inactivare a unuia dintre cei doi cromozomi. Acest fenomen pare a fi important în „procesul de numărare" a cromozomilor X înainte de inactivare (vezi mai jos).

1.3. Implicații ale mecanismelor epigenetice în controlul expresiei genice

a) Reglarea expresiei genelor prin „efecte de poziție"

Modificările structurii cromatiniene produse de diferite mecanisme epigenetice (în special represia prin *heterocromatinizare*) într-o anumită regiune a ADN *se pot propaga* la regiunile vecine. O dovadă elegantă a existenței acestui fenomen a fost adusă de rearanjările cromozomiale care, atunci când repoziționează o genă activă în proximitatea unor blocuri de heterocromatină centromerică sau telomerică, pot suprima expresia genică. Acest **efect de poziție**, demonstrat inițial la *Drosophila*, a fost identificat recent și la om. Astfel, în **distrofia musculară facio-scapulo-humerală** (OMIM # 158900), boală neuromusculară progresivă, autozomal dominantă, gena *FSHD* este situată aproape de telomerul brațului lung al cromozomului 4; în cazul în care se produce o deleție a segmentului intercalar aflat între genă și blocul de heterocromatină telomerică se reduce distanța dintre ele, iar gena (cu structură normală) este represată printr-un efect de poziție. Fenomene asemănătoare au fost descrise și în alte boli.

Pentru a limita propagarea efectelor modificărilor epigenetice unei gene și perturbarea activării sau represiei genelor vecine, cu reglări diferite, opuse, celula utilizează **izolatori** („*insulators*") care suprimă efectul de poziție. Aceștia sunt secvențe particulare de ADN (de exemplu, CCCTC) pe care se fixează anumite proteine specifice (de exemplu CTCF – *CCCTC binding Factor*) care stabilesc domenii precise de reglare a expresiei genice, împiedicând influențele reglatorii exercitate de la nivelul regiunilor învecinate.

b) Expresia monoalelică

La majoritatea genelor, ambele alele – situate în același locus pe cromozomii omologi, de origine maternă și paternă – se exprimă la nivel molecular, neexistând nici o discriminare între ele (dacă nu intervine o mutație, deci o diferență genetică). Totuși, la om mai multe gene exprimă *în mod normal numai una* din cele două alele parentale, fie pe cea maternă, fie pe cea paternă; prin această **excluzie alelică** sau **expresie monoalelică** se produce un fel de *hemizigoție funcțională*. Deși inițial era considerată o raritate, expresia monoalelică a fost demonstrată la mai multe gene și se poate împărți în două categorii.

- Excluzia alelică în funcție de originea parentală, reprezentată de fenomenul de *amprentare genomică*.
- Excluzia alelică independentă de originea parentală; decizia de excludere, prin represie, a uneia dintre cele două alele este „întâmplătoare", dar definitivă, ea transmițându-se ca atare celulelor-fiice. În acest grup se încadrează:
  - excluderea alelică asociată fenomenului de inactivare a cromozomului X;
  - excluderea alelică prin rearanjările ADN din celulele somatice (de exemplu, expresia genelor imunoglobulinelor în limfocitele B sau a receptorilor celulelor T în limfocitele T) (vezi capitolul 17);
  - excluderea alelică prin competiția pentru o secvență activatoare (*enhancer*) unică (de exemplu, genele receptorilor olfactivi ș.a.).

BIBLIOTECA CENTRALĂ UMF CLUJ

(1) Amprentarea genomică

Amprentarea genomică este un proces epigenetic (produs în cursul dezvoltării celulelor germinale) care determină exprimarea unei singure alele, într-o manieră *dependentă de originea parentală* (deci numai alela maternă sau numai alela paternă). Această expresie monoalelică este foarte importantă pentru dezvoltare și creștere.

Amprentare genomică se produce în cursul dezvoltării celulelor germinale: în primele stadii amprentele genomice parentale sunt *șterse* și apoi se *stabilesc noi amprente* în funcție de sexul embrionului, care sunt *menținute* ulterior. Defectele de amprentare se pot produce în etapele de ștergere, stabilire sau menținere a amprentei, determinând boli specifice fie prin activarea unei alele care ar fi trebuit să fie inactivă (se produce o expresie bialelică anormală), fie prin represia unei alele care ar fi trebuit să fie activă (se produce o represie completă a ambelor alele).

Identificarea primelor gene amprentate a fost posibilă prin studiul unor boli genetice a căror manifestări fenotipice depind de originea parentală a defectului genetic.

Sindromul Beckwith-Wiedemann (OMIM # 130650) este caracterizat prin gigantism, macroglosie, omfalocel și predispoziție la dezvoltarea unor tumori. Boala este produsă de erori distincte ce implică 11p15: anomalii structurale; disomie uniparentală paternă (ambele copii ale acestei regiuni sunt de origine paternă); metilare ADN anormală asociată cu *expresia bialelică* a genei pentru *factorul de creștere similar insulinei tip 2* (*IGF2*), genă exprimată în mod normal numai de pe cromozomul *patern*.

Sindroamele Prader-Willi și Angelman sunt produse, cel mai adesea, prin deleții largi ale regiunii cromozomiale **15q11-13.**

- Atunci când defectul interesează *cromozomul de origine paternă*, manifestările clinice corespund **sindromului Prader-Willi** (OMIM # 176270) caracterizat prin obezitate, hipostatură, hipogonadism și retard mental moderat. Cauza bolii este absența transcriptului *SNURF-SNRPN* ce este exprimat numai de pe cromozomul patern. Deși acest transcript codifică proteinele SNURF și SNRPN, adevăratul eveniment patogenic este deficiența a circa 80 molecule de ARNsno (*ARN small nucleolar* din grupul HBII) ce sunt codificate în interiorul unor introni ai acestei gene. Deficiența acestora afectează procesarea ARN la nivelul a numeroși loci.
- Defectele care interesează *cromozomul de origine maternă* determină **sindromul Angelman** (OMIM # 105830) caracterizat prin hipostatură, ataxie, hiperactivitate, retard mental sever cu lipsa vorbirii și crize de râs. În unele cazuri, boala este determinată de mutații ale genei *UBE3A* care codifică o ubiquitin-ligază și este exprimată la nivel cerebral exclusiv de pe *alela maternă*.

În ultimii ani, au fost identificate cel puțin 100 de gene amprentate[37]. Acestea sunt localizate cel mai adesea grupat, în anumite regiuni cromozomiale (6q24-q26, 7p12, 7q21-q22, 7q32, 8q24, 11p15, 14q32, 15q11-q13, 19q13 și 20q13). Genele amprentate au o serie de trăsături comune: expresia monoalelică care depinde de originea parentală (fie numai a alelei materne, fie numai a alelei paterne); prezența unor insule CpG în regiunea promotor sau într-un intron care suferă metilare diferențiată (dependentă de asemenea de originea parentală); prezența frecventă a unor molecule de ARN care sunt transcrise de pe catena ADN opusă (ARN antisens) – cu rol important în reglarea expresiei acestor gene.

Genele amprentate sunt implicate în controlul unor procese extrem de importante în cursul dezvoltării și, ca urmare, alterarea expresiei normale a acestora (fenomen denumit **pierderea amprentării** – de la *loss of imprinting* – LOI) este asociată cu numeroase boli, precum cancerele sau bolile asociate cu tulburări de comportament.

(2) Inactivarea cromozomului X la femei

La femeile XX, *compensarea dozajului genic* (față de bărbații XY) este realizată prin inactivarea unui cromozom X; acest fenomen apare *precoce* în cursul dezvoltării embrionare, în stadiul de blastulă. Procesul de inactivare convertește un cromozom X din forma de eucromatină activă într-o formă de heterocromatină puternic condensată și inactivă transcripțional (cromatina sexuală X sau *corpusculul Barr* în celulele epiteliale bucale). Inactivarea nu interesează cromozomul X în întregime: regiunile pseudoautozomale de la extremitățile cromozomului X (ce conțin gene prezente și pe cromozomul Y) rămân active, la fel ca și o serie de gene situați în alți loci[38]. Acest proces de inactivare este eminamente epigenetic și este inițiat și controlat de un **centru de inactivare XIC**, care a fost identificat la nivelul porțiunii proximale a brațului lung (Xq13) și conține

37. O listă a genelor amprentate la om poate fi găsită pe Internet la adresa: *www.geneimprint.com.*
38. Aproape un sfert din genele de pe cromozomul X inactiv sunt exprimate. Aceasta explică de ce anomaliile cromozomiale 45,X și 47,XXY, asociate cu alterarea dozei caracteristice fiecărui sex a unor gene specifice, produc sindroame plurimalformative specifice.

două gene ce produc ARNnc, numite *XIST şi TSIX*, implicate în inactivare.

Aşa cum am menţionat mai sus, primul eveniment observat în cadrul procesului de inactivare a cromozomului X este *împerecherea* tranzitorie a celor două regiuni XIC. Acest fenomen este important pentru procesul de „numărare" a cromozomilor X care va conduce la menţinerea activă a doar unui cromozom X pentru fiecare set diploid de cromozomi.

Iniţierea inactivării unuia dintre cei doi cromozomi X este caracterizată prin creşterea marcată a expresiei genei *XIST* (de la *X inactivation specific transcript*), ce codifică o moleculă de ARN necodant lung. Odată iniţiat, procesul de inactivare se extinde în lungul cromozomului X deoarece ARN *XIST* „îmbracă" cromozomul X inactiv.

Deşi gena *XIST* este esenţială pentru inactivarea cromozomului X, expresia sa nu este suficientă pentru realizarea acestui proces complex. De pe catena opusă celei pe care se află gena *XIST* este transcrisă gena *TSIX* care codifică un ARN cu efect reglator negativ asupra genei *XIST*; la debutul inactivării viitorul cromozom X inactiv nu mai exprimă *TSIX* şi astfel gena *XIST* funcţionează. Cromozomul X activ continuă să exprime gena *TSIX* care inactivează *XIST*. Alte modificări asociate cromozomului X inactiv sunt *metilarea ADN*, în special la nivelul promotorilor genelor, *hipoacetilarea* histonei H4, *metilarea* H3K9 şi H3K27 şi asocierea cu unele variante histonice rare.

La om, inactivarea cromozomului X este *precoce* (în stadiul de blastocist), *întâmplătoare*[39] (implicând sau X^{mat} sau X^{pat}) şi *definitivă* (ireversibilă). Ca urmare, organismul unei femei adulte este un *mozaic de clone celulare*, fiecare clonă fiind caracterizată prin menţinerea modelului de inactivare a cromozomului X care a fost stabilită în cursul vieţii embrionare. În cazul unor anomalii cromozomiale care interesează un cromozom X (cum sunt deleţiile unuia dintre cromozomii X sau translocaţiile X-autozomale) se observă *o inactivare preferenţială*, neîntâmplătoare, a cromozomului X normal. În aceste cazuri se consideră că fenomenul de inactivare s-a produs la întâmplare, dar rezultatul final este consecinţa unor procese de *selecţie secundară* în cursul dezvoltării embrionare precoce a acelor celule, care sunt caracterizate printr-un echilibru genetic mai bun.

1.4. Rolul modificărilor epigenetice în etiopatogenia bolilor umane

Recunoaşterea importanţei modificărilor epigenetice în iniţierea şi progresia bolilor umane a început cu două categorii de observaţii: identificarea unor *boli monogenice* în care mutaţiile interesează gene ce codifică proteine/enzime implicate în producerea modificărilor epigenetice; studiile alterărilor epigenetice în *cancer*. Ulterior s-au adunat numeroase date epidemiologice, clinice şi cercetări experimentale care au demonstrat că, în *bolile multifactoriale*, epigenomul este „un translator" între mediu şi genom, determinând o susceptibilitate crescută la o serie de boli comune.

(1). Există numeroase boli monogenice „clasice" – sindroamele Rubinstein-Taybi, ICF, Rett, ATRX, Beckwith-Wiedemann, Prader-Willi, Angelman, Silver-Russell – în care mutaţiile produc alterări ale proteinelor[40] implicate în modificarea cromatinei şi metilarea ADN sau amprentării genomice.

- **Sindromul Rubinstein-Taybi** (OMIM # 180849) caracterizat prin hipostatură, retard mental mediu, facies caracteristic, police şi haluce lat – este produs de mutaţiile genei ce codifică *histon-acetil-transferaza* CBP (*CREB Binding Protein*).
- **Sindromul ICF** (OMIM # 242860), boală autozomal recesivă caracterizată prin anomalii faciale, imunodeficienţă şi hipometilarea regiunilor pericentromerice cu ADN satelit ale cromozomilor 1, 9 şi 16, cu instabilitatea cromozomilor respectivi, este determinată de *mutaţiile DNMT3B*.
- **Sindromul Rett** (OMIM # 312750), boală dominantă legată de X, letală la sexul masculin, caracterizată prin dezvoltarea normală a SNC până la vârsta de 7-18 luni, urmată de o deteriorare rapidă a funcţiilor neurologice cu demenţă, autism, mişcări caracteristice ale mâinilor, ataxie şi microcefalie dobândită, este produs de *mutaţiile MECP2*. Metilarea ADN este normală la aceşti pacienţi, însă, ca urmare a absenţei proteinei MECP2 în celulele care au inactivat cromozomul X normal, o serie de gene suferă alterarea expresiei, în special în neuronii maturi.
- **Sindromul ATRX** – retard mental legat de X asociat cu alfa talassemie (OMIM # 300032) implică o alterare a proteinei ATRX, o helicază ce face parte din familia proteinelor de remodelare a cromatinei SWI/SNF.
- **Sindroamele Beckwith-Wiedemann** (OMIM # 130650), **Prader-Willi** (OMIM # 176270), **Angelman** (OMIM # 105830), **Silver Russell** (OMIM # 180860) – sunt produse de modificarea amprentării genomice (vezi mai sus).

39. La unele mamifere, precum şoarecii, există dovezi privind implicarea unor fenomene de amprentare în procesul de inactivare a cromozomului X: în trofectoderm şi structurile care derivă din acesta (precum placenta) are loc inactivarea exclusivă a cromozomului X de origine paternă.

40. În populaţie există un polimorfism al enzimelor implicate în metabolismul grupărilor metil sau acetil (de exemplu, metilentetrahidrofolat reducataza; unele variante se pot asocia cu susceptibilitatea mai mare la defecte de tub neural, boală coronariană sau cancer colorectal).

(2). Tulburările epigenetice sunt o caracteristică a **bolii canceroase** (vezi capitolul 18); au fost descrise: hipometilarea globală[41] a ADN – care generează instabilitate cromozomială, reactivarea unor elemente transpozabile, pierderea amprentării (LOI); metilarea insulelor CpG din promotorul unor gene supresoare a creșterii tumorale (*BRCA1*, *hMLH1* ș.a.); represia ARNmi cu rol de supresie tumorală. Important este că aceste modificări dobândite sunt reversibile sub acțiunea unor agenți demetilanți sau inhibitori de HDAC.

(3). Rolul interacțiunilor dintre factorii de mediu și genetici în **bolile multifactoriale** ale copilului (anomalii congenitale izolate) și adultului (bolile comune) a fost recent reevaluat din perspectiva epigeneticii prin ceea ce se numește „*ipoteza originii intrauterine*" a bolilor multifactoriale; această ipoteză se bazează pe faptul că anumite expuneri de mediu în *perioada intrauterină* influențează reglarea epigenetică și alterează traiectoriile normale de dezvoltare, producând modificări permanente ale metabolismului („*metabolic imprinting*"), structurii și funcției unor organe, care vor determina la adult un risc crescut pentru unele boli comune: obezitate, sindrom metabolic, diabet zaharat tip 2, boli cardiovasculare, renale, neurodegenerative, psihice, autoimune etc. Uneori aceste modificări se pot transmite în „*transgenerațional*" (vezi caseta 4.2).

Există argumente epidemiologice, clinice și experimentale că epigenotipul modulează efectele genotipului; la rândul său, epigenotipul este afectat de mediul de viață (inclusiv intrauterină), vârstă, epigenotipul părinților și genele (inclusiv genele ARN) care reglează conformația cromatinei și metilarea ADN. Anumite combinații între modificările epigenetice și genom pot determina o susceptibilitate crescută la bolile multifactoriale comune ale adultului, inclusiv cardiovasculare, metabolice, neuropsihice și cancer. De aceea, unul dintre obiectivele prioritare după descifrarea structurii genomului uman este descifrarea epigenomului.

2. Reglarea transcripțională

Controlul transcripțional al expresiei genice vizează reglarea activității ARN-polimerazei II, enzima ce transcrie genele care codifică proteine și sintetizează ARNm. Reglarea transcripțională implică interacțiunea unor proteine (*factori trans-reglatori*) cu secvențe specifice de pe ADN (*elemente cis-reglatoare*). Această interacțiune determină transcripția specifică *a unor gene* într-un anumit *tip celular* și într-un anumit *moment* pentru a se produce o *cantitate adecvată* dintr-o anumită proteină. Fiecare genă posedă „un sistem propriu de reglare" alcătuit din *mai mulți factori transcripționali* care nu sunt însă specifici unei singure gene. Acțiunea lor particulară este produsă prin *combinația specifică* a anumitor factori de transcripție și elemente cis-reglatoare ale genei. Situația este comparabilă cu „scrisul" sau „muzica", în care un număr limitat de simboluri sau sunete permite o infinitate de combinații diferite.

2.1. Elementele cis-reglatoare

Elementele *cis*-reglatoare sunt secvențe scurte de ADN ale căror funcții sunt limitate la o anumită genă. Ele facilitează fixarea unor factori „*trans*-reglatori" specifici (factori de transcripție), care permit recunoașterea genei de către ARN-polimerază și reglează specificitatea și intensitatea transcripției, adaptând-o la nevoile celulare.

Reamintim (vezi capitolul 3.B.1.2) că unele elemente *cis*-reglatoare au o localizare perfect definită în promotorul genei: *TATA*, *CAAT*, *GC*; pe aceste secvențe se fixează factorii de transcripție generali care formează, împreună cu ARN-polimeraza, *complexul de inițiere a transcripției* sau „complexul transcripțional bazal" (vezi capitolul 4.C.1.2). Alte secvențe (situate mai în amonte) conferă *specificitatea tisulară* a expresiei genelor ce le posedă, iar *secvențele RE*[42] (de la *responsive element*) fixează factori transcripționali inductibili, activați în prealabil de un *stimul extracelular*: hormoni, AMPc, ioni etc. Un ultim tip de secvențe au o localizare variabilă (în regiunea 5' sau în 3', sau în introni) și *reglează intensitatea transcripției* unei gene, acționând la distanță de aceasta; ele pot fi **secvențe activatoare** (amplificatoare) ale transcripției (*enhancers*) sau **secvențe atenuatoare** (*silencers*). De menționat că reglarea expresiei genice se face pe domenii discrete ale ADN, grație unor **izolatori** („insulators") care împiedică propagarea influențelor reglatorii la regiunile vecine („*enhancer blocking*") sau separă domeniile de cromatină activă sau inactivă

Se poate spune că regiunile reglatoare ale unei gene sunt constituite dintr-o *serie caracteristică de module* (potențial reglatoare) pe care se fixează factorii de transcripție, realizând o *anumită combinație* de elemente *cis* și *trans* reglatoare. Prin interacțiunea lor se produce *o modificare a cromatinei*, care creează o structură spațială ce permite ARN-polimerazei să se poziționeze lângă situsul de inițiere a

41. Hipometilarea a fost observată și în procesul de îmbătrânire fiind posibil asociată cu pierderea represiei unor gene.
42. Pentru a indica activatorul unui RE se adaugă o literă suplimentară: GRE pentru elementul de răspuns la glucocorticoizi; ERE pentru răspunsul la estrogeni, TRE pentru hormonul tiroidian, ARE pentru androgeni, CRE pentru răspunsul la AMPc etc.

CASETA 4.2

Impactul mecanismele epigenetice în dezvoltarea bolilor comune ale adultului

*De-a lungul întregii vieţi organismul uman este supus unor influenţe diverse ale mediului înconjurător care au capacitatea de a altera nu numai stabilitatea genomului (mutaţii), dar şi pe cea a epigenomului (**epimutaţii**), cu consecinţe asupra riscului de dezvoltare a unor boli comune ale adultului. Cercetările efectuate în ultimii ani au început să identifice o serie de factori din mediul înconjurător care pot induce modificări epigenetice. Asemenea factori includ: unele substanţe chimice sau nutritive, factori fizici şi chiar comportamentul matern. Aceştia pot induce o varietate de modificări epigenetice, precum modificări ale metilării ADN, modificări histonice şi chiar modificări ale conformaţiei cromatinei, însă mecanismele moleculare prin care sunt induse aceste modificări epigenetice sunt încă foarte puţin înţelese.*

*Capacitatea factorilor de mediu de a induce modificări epigenetice pare să fie dependentă de momentul în cursul dezvoltării în care aceştia acţionează asupra organismului. O perioadă care pare să fie extrem de susceptibilă pentru influenţa factorilor din mediul înconjurător este perioada de dezvoltare intrauterină. Această descoperire a condus la dezvoltarea conceptului de **origine intrauterină a bolilor adultului**. Acest concept presupune transmiterea cu fidelitate a modificărilor epigenetice apărute în perioada intrauterină în cursul numeroaselor diviziuni mitotice din viaţa unui individ şi inducerea unor modificări fiziopatologice ce conduc la apariţia bolii la adult. Susceptibilitatea la apariţia unor modificări epigenetice induse de mediu pare să fie diferită pentru diverse ţesuturi, cu consecinţe asupra spectrului de boală. Principalele boli comune care par a fi susceptibile la influenţa factorilor de mediu ce acţionează în perioada de dezvoltare intrauterină sunt: boala coronariană, diabetul zaharat tip 2, obezitatea, bolile autoimune şi unele boli psihiatrice.*

Un studiu experimental recent[43] *efectuat de un grup de cercetători din Cambridge, la care a participat şi colegul nostru Ionel Sandovici, a arătat că dieta necorespunzătoare a mamei în cursul sarcinii induce apariţia unor modificări epigenetice la nivelul regiunii* enhancer *a genei HNF4A (cu rol important în dezvoltarea pancreasului şi controlul producţiei de insulină), care determină reducerea expresiei genei şi creşte susceptibilitatea copiilor acestora la apariţia, în perioada de adult, a unor boli comune, precum diabetul zaharat.*

*Modificările epigenetice induse de factorii de mediu par a fi transmisibile nu numai în cadrul diviziunilor mitotice, dar şi în cadrul celor meiotice (atât prin gametogeneza masculină cât şi prin cea feminină), conducând la apariţia fenomenului de **transmitere epigenetică transgenerațională**. Acest fenomen, susţinut de o serie de cercetări epidemiologice efectuate la om cât şi de studii experimentale efectuate pe modele animale sugerează faptul că expunerile la unii factori de mediu pot influenţa riscul de boală nu numai pentru individul expus, ci şi pentru urmaşii acestuia. Consecinţa directă a acestui fenomen este apariţia unei agregări familiale a unor boli comune care poate indica în mod fals implicarea unor cauze genetice.*

*Prin prisma informaţiilor menţionate mai sus este logic faptul că măsurarea cantitativă a unor modificări epigenetice reprezintă o modalitate nouă de identificare a expunerilor la o serie de factori de mediu nefavorabili sau de depistare precoce a unor boli comune (**biomarkeri epigenetici**). Mai mult, datorită caracterului lor potenţial reversibil, modificările epigenetice constituie în prezent o ţintă de real interes pentru dezvoltarea unor noi metode de tratament şi profilaxie a bolilor comune ale adultului.*

43. Sandovici I, Smith NH, Nitert MD, Ackers-Johnson M, Uribe-Lewis S, Ito Y, Jones RH, Marquez VE, Cairns W, Tadayyon M, O'Neill LP, Murrell A, Ling C, Constância M, Ozanne SE. *Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the Hnf4a gene in rat pancreatic islets*. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, PMID: 21385945.

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

transcripției și să declanșeze procesul de transcripție, în anumite celule și cu o anumită viteză.

2.2. *Factorii de transcripție trans-reglatori*

Factorii de transcripție trans-reglatori[44] sunt proteine reglatoare care se fixează pe elementele cis-reglatoare ale ADN (de regulă, în marea incizură a dublei elice a ADN) și interacționează cu alte proteine, determinând inițierea sau reglarea transcripției. Factorii de transcripție sunt vitali pentru numeroase procese celulare: controlul ciclului celular, diferențierea celulară și dezvoltarea organismului, răspunsul (semnalizarea) la semnalele inter- și extracelulare etc.

Factorii de transcripție sunt de obicei *dimeri* (hetero- sau homodimeri). Fiecare monomer posedă cel puțin două domenii: *domeniul de fixare la ADN* (la promotor sau RE) și *domeniul activare al transcripției* prin care interacționează cu alți factori de transcripție pentru a regla transcripția. Unii factori de transcripție pot conține un al treilea domeniu *senzor al semnalelor externe* (un situs de fixare a unor liganzi: hormoni, ioni etc.) sau *cofactori,* prin care factorii de transcripție pot fi activați/dezactivați.

Domeniul de fixare la ADN are o structură particulară de aminoacizi ce formează un „motiv structural" specific; în funcție de alcătuirea sa, există mai multe superfamilii de factori de transcripție (figura 4.23). Cele mai importante familii de factori de transcripție sunt:

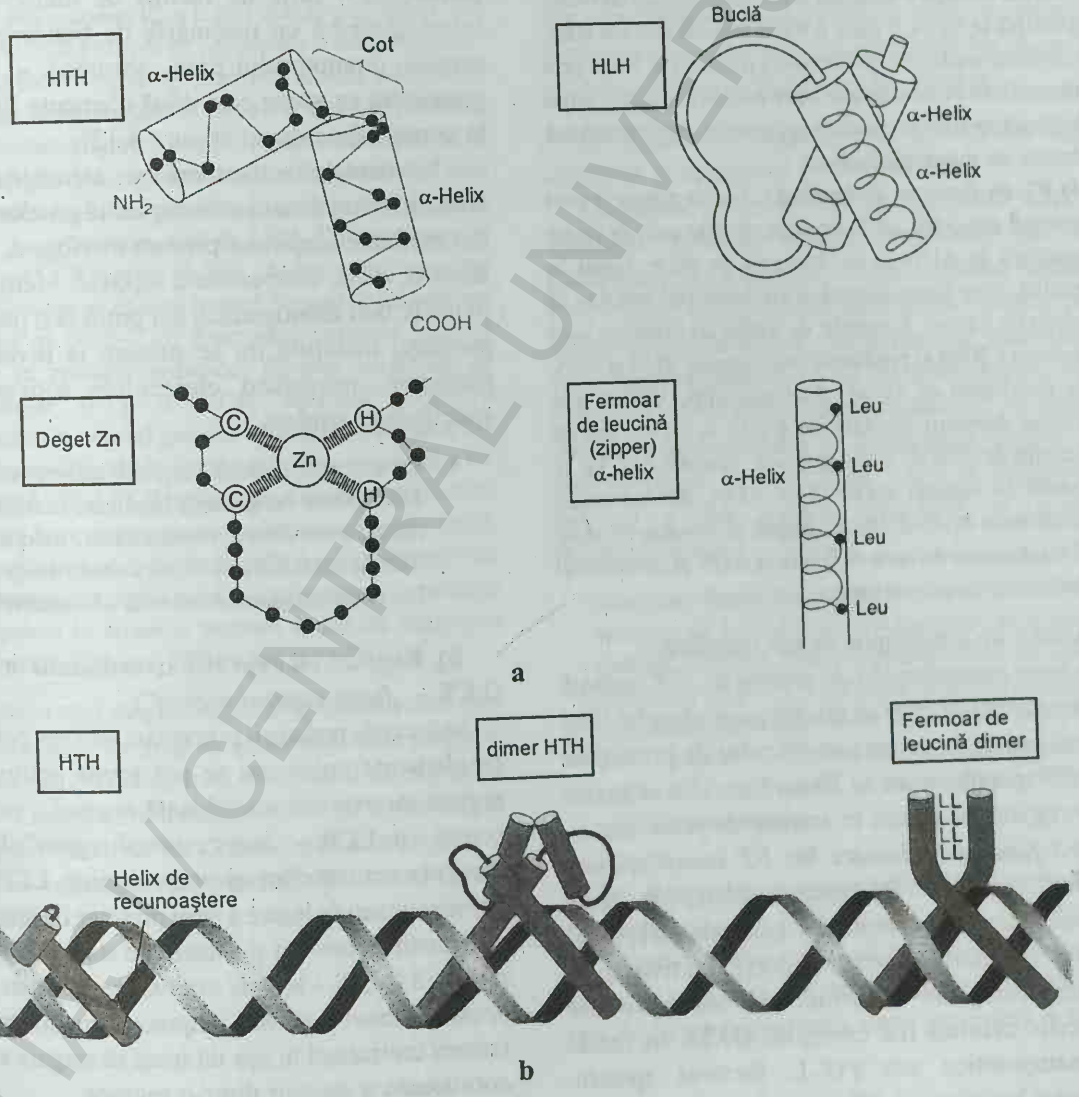


Figura 4.23. Reprezentarea schematică a diferitelor tipuri de domenii de fixare la ADN a factorilor de transcripție
(după Strachan și Read, 1999)

a) Domeniile structurale ale unor factori de transcripție: HTH, elice-cot-elice; HLH, elice-buclă-elice; degete de Zn (C-cisteină, H-histidină). b) Fixarea factorilor de transcripție la ADN cu ajutorul domeniilor de fixare

44. Se numesc „trans" pentru că sunt proteine produse de alte gene decât cele asupra cărora acționează.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(1) FT în *degete de zinc* („*zinc finger*"), în care aminoacizii se dispun spațial sub forma unor degete de mănușă, la baza cărora se fixează (de cisteină și/ sau histidină) un ion de Zn^{2+}, indispensabil activității proteinei; din această categorie fac parte receptorii nucleari de hormoni și proteina Sp1 care se fixează pe promotorul a numeroase gene comune.

(2) FT *elice-cot-elice* („*helix-turn-helix*"), în care aminoacizii ce alcătuiesc domeniul de fixare la ADN formează două elice unite între ele printr-un „cot" ce produce o rotație prin care cele două elice sunt orientate în planuri diferite; acest tip de structură (numit și *homeo-domeniu*) se întâlnește într-o serie de proteine care reglează procesele de dezvoltare, numite *homeoproteine*: *proteinele HOX, SOX* etc.

(3) FT *elice-buclă-elice* („*helix-loop-helix*") sunt proteine dimerice alcătuite dintr-un domeniu de fixare specifică la ADN, o elice, o buclă laterală și o altă elice; cele două molecule ce formează dimerul se leagă prin interacțiuni ce se stabilesc între zonele din elice; astfel de structuri sunt prezente la proteinele care stimulează sinteza de imunoglobuline.

(4) FT cu *fermoar de leucină* („*leucin zipper*") sunt proteine dimerice, alcătuite dintr-un domeniu de fixare specifică la ADN și un domeniu în elice, bogat în leucină, care interacționează cu domeniul omolog al celeilalte catene. Exemple de astfel de proteine sunt proteina CREB și produsele oncogenelor *JUN* și *FOS*. De menționat că factori de transcripție diferiți pot conține domenii similare de fixare la ADN, dar au domenii diferite de trans-activare; în acest caz, TF se fixează la aceeași secvență de ADN, dar activează transcripția în mod diferit. Există și situația inversă: TF cu domenii diferite de fixare la ADN și cu domenii identice de trans-activare.

Factorii de transcripție se pot clasifica:

- *pe baza mecanismului de acțiune* în: *FT generali* care interacționează cu miezul promotorului fiind implicați în formarea complexului de preinițiere și *FT specifici* care se fixează pe alte elemente *cis*-reglatoare situate în amonte de promotor;
- *după funcția reglatoare* în: *FT constituționali activi*, prezenți în toate celulele, în toate momentele (de exemplu, FT generali, Sp1, NF1) și *FT condiționali activi* (necesită activare); în ultima categorie se includ: *FT de dezvoltare* specific celulari (de exemplu, GATA în celule hematopoietice sau PIT-1, factorul specific glandei hipofize) și *FT dependenți (activați) de semnale externe* (extracelulare – endocrine sau paracrine, intracelulare – autocrine) sau de receptori membranari.

2.3. Controlul la distanță al expresiei genice

a). Elemente activatoare (*enhancers*) și atenuatoare (*silencers*)

Aceste elemente mediază reglarea pozitivă și, respectiv, negativă a activității transcripționale a unei gene. Activitatea lor este independentă de poziția și de orientarea lor în raport cu gena pe care o reglează. Ca urmare, aceste elemente pot fi localizate proximal sau distal de regiunea promotor a genei-țintă, uneori chiar în interiorul altor gene. Mecanismele prin care elementele activatoare influențează activitatea regiunilor promotor nu sunt precis înțelese. Modelul cel mai acceptat este acela că regiunile activatoare recrutează o serie de factori de transcripție care interacționează cu mașinăria de transcripție de la nivelul promotorului-țintă, formând *o buclă de cromatină* ce aduce cele două elemente funcționale în contact fizic direct (figura 4.13).

Elementele activatoare și atenuatoare joacă adeseori roluri dinamice în răspunsul genelor la stimuli din mediul înconjurător precum morfogeni, hormonii steroizi, dietă, temperatură, hipoxie. Menționăm că în unele boli monogenice, cel puțin la o parte dintre pacienți, mutațiile nu se produc la nivelul genei implicate, interesând elementele activatoare cu specificitate tisulară.

- De exemplu, mutațiile regiunii activatoare[45] a genei *SHH* (*Sonic hedgehog*), implicată în stabilirea axei antero-posterioare a membrelor, determină polidactilia preaxială ca urmare a alterării expresiei *SHH* la nivelul mugurelui anterior al membrelor.

b). Regiuni cu expresie coordonată a genelor (LCR – „*locus control region*")

Secvențele reglatorii prezentate mai sus pot acționa ca elemente unice sau se pot grupa pentru a crea regiuni cu expresie coordonată a genelor pe care le conțin sau **LCR** – „*locus control region*". Pe lângă prezența activatorilor și atenuatorilor, LCR conțin adesea situsuri de legare a unor proteine de remodelare a cromatinei, precum și situsuri de atașare la matricea nucleară (MAR – *matrix attachment regions*). Toate aceste elemente permit împreună modularea arhitecturii cromatinei în așa fel încât să asigure expresia coordonată a genelor dintr-o regiune.

Unul dintre exemplele cele mai intens studiate de LCR este acela al locilor care conțin genele din familiile alfa și beta globinelor. Genele din familia alfa-globinei (ζ, α1, α2) și familia beta-globinei (ε, γ, δ și β) sunt situate

45. Aceast element activator este localizat la o distanță de circa 1 Mb față de gena *SHH*, în intronul genei *LMBR1*.

BCU TRANSILVANIA LIBRARY

una după alta (vezi figura 3.14) în aceeaşi buclă cromatiniană. Expresia lor în linia eritroidă este determinată de nişte situsuri situate la extremităţile buclei, direct accesibile proteinelor reglatoare. Aceste elemente LCR asigură reglarea temporală şi specificitatea tisulară a expresiei genelor din familia b-globinei: genele globinelor sunt activate într-o secvenţă temporală precisă, în anumite stadii ale dezvoltării ontogenetice, care corespunde cu ordinea lor lineară pe cromozom.

În cursul dezvoltării umane se sintetizează forme diferite de hemoglobină embrionară, fetală, adultă (vezi şi caseta 3.3). La această *diversitate ontogenetică* a tipurilor de Hb se adaugă şi faptul că procesul de sinteză a Hb are loc în *situsuri diferite* în diferite perioade (sac vitelin, ficat, splină, măduvă osoasă). Ambele fenomene implică activarea şi inactivarea secvenţială, în momente precise şi ţesuturi variate, a diferitelor gene ce alcătuiesc familia alfa-globinei (ζ, $\alpha 1$, $\alpha 2$) şi beta-globinei (ε, γ^G, γ^A, δ şi β); acest proces de *„comutare a hemoglobinei"* (*„hemoglobin switching"*) permite sinteza subunităţii adecvate de hemoglobină pentru o anumită perioadă de dezvoltare (figura 3.14). Interesant este faptul că în familia β globinei expresia temporală a genelor se face *în direcţia 5'→3', în ordinea ($\varepsilon \rightarrow \gamma \rightarrow \beta$) în care se găsesc pe cromozom*, faţă de LCR. De asemenea s-a stabilit că LCR pentru globină are mai multe secvenţe *cis-reglatoare* pe care se fixează factorii de transcripţie GATA-1 şi NFE-2 ce determină expresia genelor numai în celulele eritroide. Fixarea factorilor de transcripţie (FT) la LCR *modifică structura cromatinei* la nivelul genelor beta, permiţând altor FT să acceseze gene individuale din grup. Apoi, între FT fixaţi pe LCR şi FT fixaţi pe promotorul unei anumite gene are loc o interacţiune (inclusiv o apropiere fizică, prin realizarea unei bucle în ADN) care activează sau represează transcripţia unei anumite gene. Comutările de expresie în anumite ţesuturi se fac de asemenea prin intervenţia unor FT tisulari specifici.

Abilitatea unei singure regiuni de control, cum este LCR, să regleze un grup de gene şi nu una singură, reprezintă un nivel superior de control al expresiei genice[46]. Controlul combinat prin LCR şi factori de transcripţie specifici în diferite ţesuturi produc o comutare ordonată a sintezei Hb în cursul dezvoltării.

2.4. Reglarea transcripţiei ca răspuns la semnale extracelulare

Toate activităţile celulare sunt reglate prin mecanisme care modulează transcripţia ca răspuns la *semnale*[47] *extracelulare (stimuli)*, numite generic **liganzi**; ei se fixează pe receptori celulari[48] şi produc, direct sau indirect, o activare *temporară şi reversibilă* a transcripţiei unor gene (*„expresia inductibilă a genelor"*) care determină o modificare a funcţiilor celulare: metabolism, proliferare, diferenţiere, mişcare, apoptoză etc. Indiferent de mecanism, punctul final în acest tip de reglare este acelaşi: un *factor de transcripţie prezent în celulă sub o formă inactivă este activat specific* de elemente ale căii de semnalizare şi apoi se fixează la secvenţele reglatoare specifice (numite *elemente de răspuns*) din regiunea promotor a genelor-ţintă, stimulând transcripţia lor. Activarea sa se poate face prin mai multe procese.

a) Activarea transcripţiei printr-un ligand difuzibil şi receptori intracelulari

Hormonii hidrosolubili cu moleculă mică (de exemplu, hormonii steroizi, tiroidieni) sau unele morfogene (de exemplu, acidul retinoic) difuzează prin membrana celulelor-ţintă şi se fixează pe un **receptor intracelular**, citoplasmatic sau nuclear, care funcţionează ca *factor de transcripţie inactiv* (figura 4.24). După fixarea ligandului se produce activarea receptorului şi complexul ligand (hormon)-receptor se fixează pe ADN la elementul de răspuns a mai multor gene-ţintă şi activează transcripţia lor.

Receptorii steroizi fac parte din *superfamilia receptorilor nucleari de hormoni*. Aceşti receptori au o structură globală identică, fiind alcătuiţi dintr-un *domeniu central de fixare la ADN* (cu o structură *în degete de zinc*, foarte asemănătoare la diferiţi receptori) flancat de un *domeniu C-terminal de fixare a hormonului* (ce activează transcripţia) şi un domeniu N-terminal specific receptorului.

b) Activarea transcripţiei prin transducţia semnalului

Anumiţi factori extracelulari (factori de creştere, hormoni peptidici, citokine, neurotransmiţători etc.) pot declanşa transcripţia unor gene fără a intra în

46. Asemenea mecanisme au fost descrise şi pentru alte grupe de gene (de exemplu, genele pentru receptorii limfocitelor T).
47. Se deosebesc patru tipuri de semnalizare celulară: (1) semnalizarea directă (*juxtacrină*), celulă-celulă: un semnal de pe suprafaţa unei celule (de exemplu, un factor de creştere) este fixat de un receptor specific al altei celule; (2) semnalizarea *endocrină*: hormonii se fixează pe receptori specifici din celulele-ţintă; (3) semnalizarea *paracrină*: o moleculă eliberată de o celulă (de exemplu, un neurotransmiţător) acţionează local asupra celulelor vecine; (4) semnalizarea *autocrină*: o moleculă produsă de o celulă acţionează asupra receptorilor celulei respective.
48. Receptori pentru hormoni peptidici, prostaglandine şi lipide înrudite, diferiţi neurotransmiţători, cationi de Ca2+ etc. sau receptori gustativi, olfactivi, vizuali.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

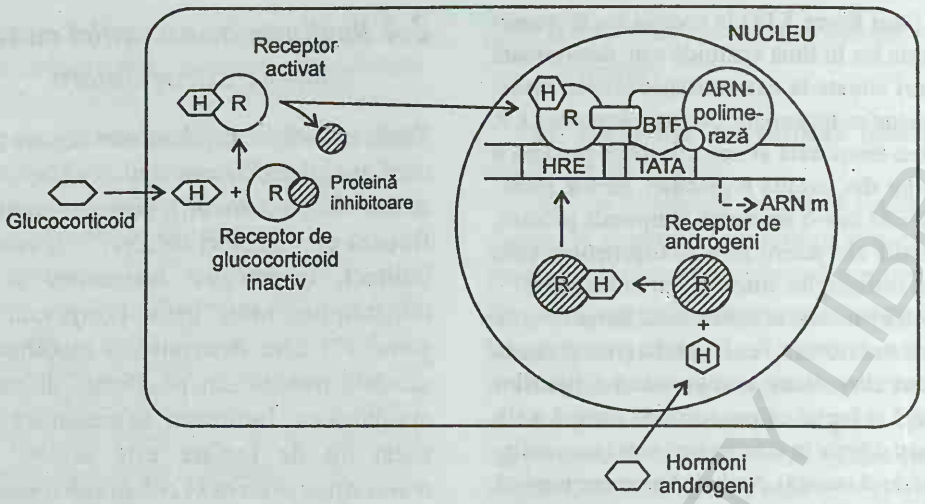


Figura 4.24. Modelul transcripției indusă de hormoni steroizi
(modificat după Hoffee)

H RE – element de răspuns la hormon; B FT– factori de transcripție bazali

celule (nu pot trece prin membrana plasmatică). Ei se fixează pe un *receptor specific* ancorat în membrana celulară. După fixarea ligandului, receptorul își modifică conformația spațială a domeniului intracitoplasmatic și devine *activ* (dobândind activitate kinazică sau activând kinaze intracelulare); în această stare, el *transmite* semnalul ligandului altor molecule intermediare, În final este activat un factor de transcripție, care modulează expresia genei. Prin activarea transcripției unor gene specifice, acest proces, numit **transducția semnalului**, joacă un rol important în controlul metabolismului, diviziunii celulare, creșterii și diferențierii apoptozei.

Există două mecanisme posibile de transducție (figura 4.25).

- *Transducția directă*, când receptorul („cu un singur pasaj membranar") dotat cu activitate tirozin-kinazică (*recepor RTK*)[49] sau serin-treonin kinază (receptor RSTK) recunoaște semnalul extracelular și îl *traduce el însuși*, declanșând autofosforilarea unui reziduu aminoacidic din segmentul său intracitoplasmatic; se produc o serie de reacții intracelulare ce implică activarea *RAS* și apoi activarea în cascadă a **kinazelor *MEK*, *MAPK* și *ERK***. În final, kinaza *MAP* activată este translocată în nucleu unde activează transcripția genelor țintă.

  O cale mai scurtă de transmitere a semnalului (folosită de citokine) – **calea JAK-STAT** – implică activarea unei proteine *JAK*[50] (tirozin-kinaze citoplasmatice), care la rândul ei activează un factor de transcripție *STAT* (de la *signal transducer and activator of transcription*); el pătrunde în nucleu și activează transcripția unor gene.
- *Transducția indirectă* în care receptorul („cu șapte pasaje membranare") *cuplat* cu o **proteină G** (de la GTP – *binding regulatory proteins*)[51] este activat și prin interacțiuni cu alte proteine din *calea de transducție a semnalului* cunoscute ca *„mesageri secunzi"*[52] (AMP ciclic, GMP ciclic, Ca^{2+}, fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP_2), molecule lipofile, oxidul nitric ș.a.), transmite semnalul la un *efector*, în cazul de față unui factor de transcripție inactiv, care prin activare va stimula transcripția.

În figura 4.25 sunt prezentate (după Wikipedia) principalele tipuri de receptori și căi de transducție a semnalelor ce determină activarea transcripției, proliferării celulare și apoptozei (detalii www.en.wikipedia.org.)

2.5. *Selectarea promotorilor*

Unele gene umane au *doi sau mai mulți promotori* și, prin folosirea lor *alternativă*, se pot produce diferite **izoforme** ale unei proteine, cu proprietăți diferite: sinteza în țesuturi diferite sau perioade diferite de dezvoltare, localizarea subcelulară sau capacitatea funcțională variată. Promotorii au „forțe" inegale, determinând tipul și cantitatea de mesager transcris. *Alegerea promotorilor* nu se face

49. Numeroși receptori RTK sunt fixați pe **cilul primar**, o proeminență a celulei în mediul extracelular, care s-a dovedit recent că funcționează ca un senzor („antenă") la modificările mediului extracelular, determinând un răspuns adecvat al celulei.
50. Denumirea „JAK" provine de la *„Janus kinase"* și face aluzie la Janus, zeul roman cu 2 fețe, care era zeul porților.
51. Pentru descoperirea proteinei G și rolului acestei proteine în semnalizarea celulară, Martin Robbell și Alfred Gilman au primit în 1994 Premiul Nobel.
52. Primul mesager fiind molecula de semnalizare extracelulară.

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

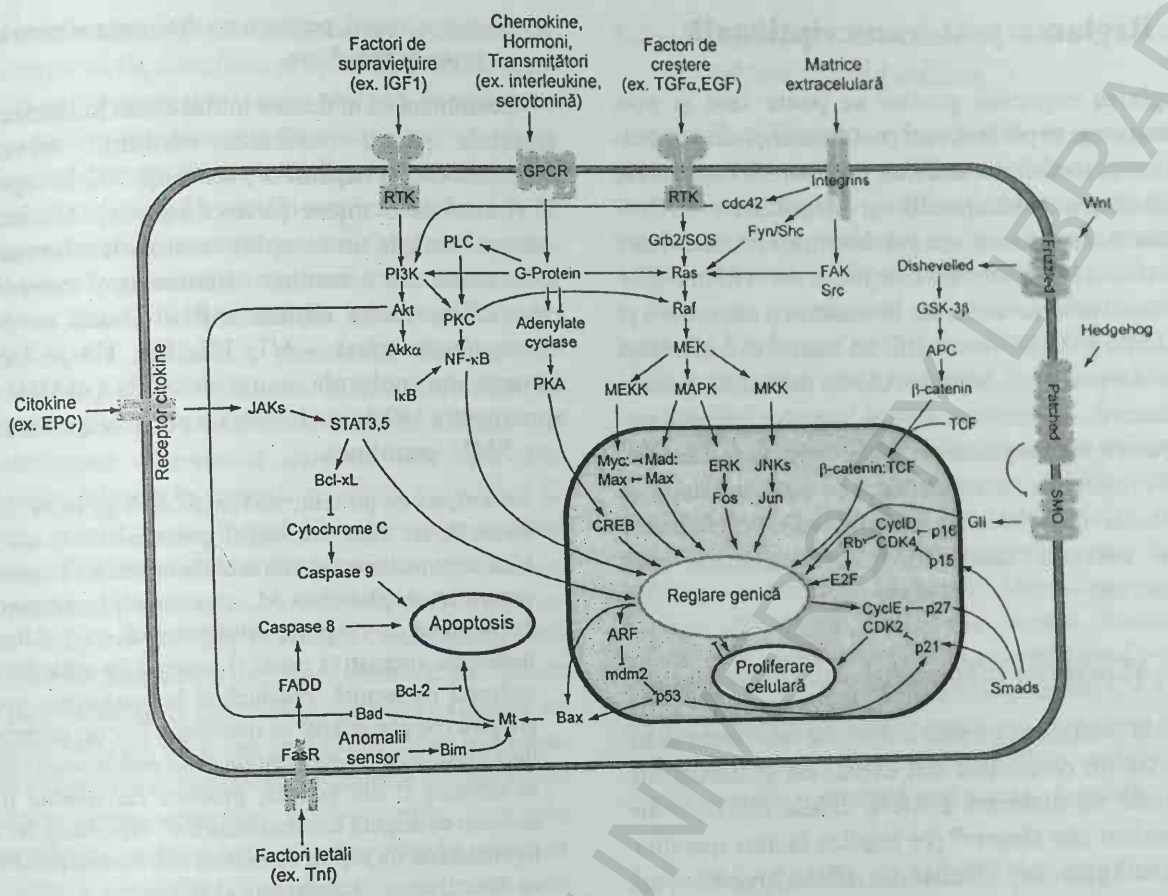


Figura 4.25. Căile de transducție a semnalelor extracelulare
(după Wikipedia, 2010)

la întâmplare, ci prin acțiunea unor factori *trans*-regulatori, dintre care unii sunt specifici unui țesut; acest fapt explică de ce unele țesuturi exprimă un tip de mesager, iar alte țesuturi un alt tip (de exemplu, α-amilaza; figura 4.26).

Un exemplu, frecvent citat, de selecție a promotorilor privește gena gigantă a *distrofinei* (2,4 Mb; 79 exoni) care are cel puțin opt promotori. Patru promotori sunt situați în regiunea reglatoare 5' și sunt specifici pentru cortexul cerebral, mușchi, cerebel, limfocite și determină patru izoforme mari de distrofină, diferite prin capătul amino-terminal, datorită folosirii alternative a exonului 1. Alți patru promotori sunt „interni", în structura zonei centrale a genei; transcripția care începe de la nivelul acestor promotori va folosi numai o parte din exoni, rezultând izoforme mici de distrofină, prezente în rinichi, retină, celulele Schwann.

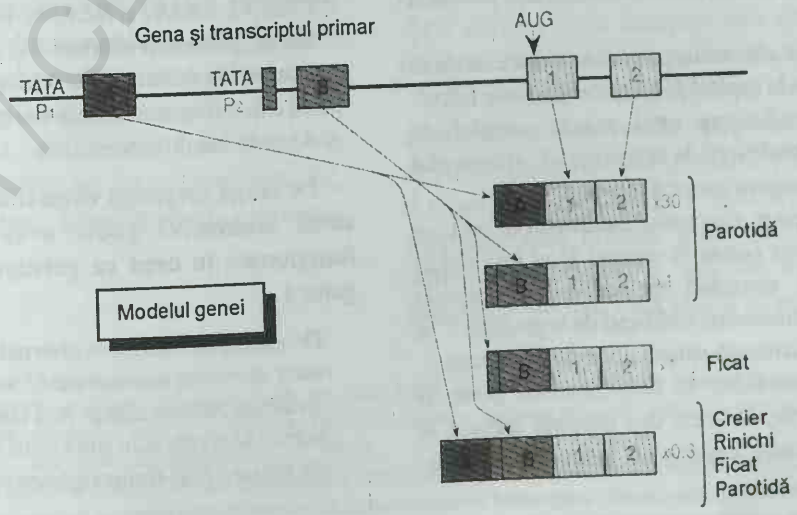


Figura 4.26. Selecția promotorilor în cazul genei α-amilaza
(modificat după Kaplan și Delpech, 1993)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Reglarea post-transcripțională

Reglarea expresiei genelor se poate face și prin mecanisme ce pot interveni post-transcripțional, mecanisme ce modifică maturarea, transportul, localizarea, eficacitatea traducțională și degradarea ARNm matur. Aceste mecanisme pot determina fie modificări calitative în informația conținută de ARNm, spre exemplu prin mecanismele de *matisarea alternativă* și *editarea* a ARN, fie modificări cantitative afectând abundența moleculelor de ARNm diponibile pentru traducere. Aceste mecanisme, deseori combinate, implică recunoașterea unor secvențe specifice din ARN (elemente *cis*-regulatoare) de către proteine sau molecule de ARNmi (elemente *trans*-regulatoare). Vom prezenta câteva dintre mecanismele mai cunoscute.

3.1. Matisarea alternativă sau diferențială

Genele multiexonice sunt transcrise sub forma unui pre-ARNm ce conține atât exoni, cât și introni. În procesul de maturare a ARN, celula folosește un mecanism „de alegere" (ce implică factori specifici de țesut) prin care *elimină din ARNm precursor* nu numai intronii, ci și unii exoni codanți. Prin acest proces de *matisare alternativă*, dintr-un transcript primar se formează mai multe molecule diferite de ARNm matur care, prin translație, vor produce mai multe proteine diferite corespunzătoare aceleiași gene numite *izoforme* (figura 4.16).

În matisarea alternativă sunt implicate cinci mecanisme diferite:

- *saltul unui exon* („*exon skipping*") în care un exon este îndepărtat din ARNm matur;
- *exoni mutuali exclusivi*, mecanism în care este ales unul sau altul din doi exoni adiacenți, însă niciodată ambii;
- *situsul donor alternativ*, mecanism în care un alt sit donor (situat la capătul 5' al intronului) este folosit, generând includerea unui număr variabil de aminoacizi codificați de segmentul 3' al exonului ce precede situsul donor alternativ;
- *situsul acceptor alternativ*, mecanism în care un alt sit acceptor (situat la capătul 3' al intronului) este folosit, generând includerea unui număr variabil de aminoacizi codificați de segmentul 5' al exonului ce urmează situsul acceptor alternativ;
- *reținerea intronului*, în care intronul poate fi matisat sau nu; în acest caz intronul trebuie să conțină un cadre deschis de lectură, în fază cu exonii vecini, pentru a nu determina sinteza unei proteine trunchiate.

Reamintim că în fiecare intron există trei elemente esențiale pentru realizarea matisării: secvența consesus GU la capătul 5', secvență AG la capătul 3' și situl de branșare (*branching site*). Matisarea este realizată de un complex multimolecular numit *spliceozom* ce conține numeroase *complexe ribonucleoproteice* numite snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*) – U1, U2, U4, U5 și U6 – formate din molecule scurte de ARN (snARN de aproximativ 150 de nucleotide) și proteine (proteinele Sm, SMN, gemiline).

Uneori, aceste proteine au funcții analoge (sunt „izoforme"), așa cum este cazul genei mielinei, sau au localizări tisulare sau intracelulare diferite[53] (genele pentru imunoglobulina M, tropomiozină, receptorul hormonului de creștere, eritropoietină etc.). Alteori matisarea alternativă poate fi asociată cu schimbarea cadrului de lectură, conducând la producerea unor proteine complet diferite ca structură și funcție; exemplul deja clasic este reprezentat de *gena calcitoninei* care, în celulele C din tiroidă, produce *calcitonina* (un hormon ce asigură homeostazia Ca^{2+} circulant), iar în hipotalamus, un *peptid înrudit cu calcitonina* (CGRP) cu funcții neuromodulatoare și trofice.

Fenomenul de *selecție a exonilor* – matisare alternativă – se întâlnește la numeroase gene umane, explicând probabil faptul că, prin utilizarea a circa 21.000 de gene, se pot sintetiza peste 100.000 de tipuri diferite de proteine.

Utilizarea unor tehnologii recente de analiză a întregului transcriptom a demonstrat că țesutul cu numărul cel mai mare de izoforme de ARNm este creierul, ceea ce este explicat probabil prin diversitatea foarte crescută a tipurilor celulare înalt specializate. Un exemplu extrem este cel al celor trei gene care codifică neurexinele (*NRXN1*, *NRXN2* și *NRXN3*). Fiecare dintre aceste gene are doi promotori alternativi și peste 20 de exoni ce sunt matisați în molecule de ARNm matur ce conțin circa 10 exoni. Împreună, cele trei gene produc circa 3.000 de proteine diferite.

Pe lângă creșterea diversității proteinelor, matisarea alternativă poate avea și alte consecințe funcționale în ceea ce privește reglarea expresiei genice.

De exemplu, matisarea alternativă poate duce la adiția unor secvențe netranslate 5' sau 3' (UTR) diferite în structura ARNm matur. Așa cum vom discuta mai jos, aceste secvențe sunt ținta unor mecanisme importante de reglare post-transcripțională mediate de ARNmi.

53. Matisarea alternativă poate duce la includerea sau excluderea unor domenii funcționale ale unor proteine (domenii transmembranare sau semnale de localizare în anumite compartimente intracelulare).

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Mecanismele ce controlează matisarea alternativă au început să fie descifrate și aplicații practice sunt întrevăzute, în special în terapia genetică. În molecula de preARNm sunt prezente elemente *cis*-activatoare sau *cis*-inhibitoare ale matisării[54], localizate în apropierea siturilor 5' și 3', care, în asociere cu elementele *trans*-activatoare sau represoare[55], reglează modul de folosire în procesul de matisare a siturile donor și acceptor situate la extremitățile intronilor. În plus, specificitatea tisulară a procesului de matisare alternativă implică existența a unor diferențe în natura acestor proteine care se leagă la ARNm.

Matisarea alternativă dirijată este una din tehnicile folosite în terapia genetică. Principiul ei constă în înlăturarea dirijată a unui exon ce conține o mutație ce introduce o schimbare de aminoacid sau un codon stop prematur, cu condiția ca ARNm mai scurt obținut să codifice o proteină ce păstrează, total sau parțial, activitatea proteinei normale. În funcție de faza exonilor ce precedă și urmează exonului ce conține mutația, unul sau mai mulți exoni trebuiesc matisați pentru a păstra cadrul deschis de lectură ce permite sinteza proteinei. Spre exemplu, mutațiile punctiforme ce introduc un codon stop în regiunea centrală a genei DMD ar putea fi eliminate prin această tehnică, permițând „*înlocuirea*" fenotipului de distofie musculară Duchenne cu un fenotip mai puțin grav, cel de distrofie musculară Becker.

3.2. *Poliadenilarea alternativă*

În cazul matisării alternative de exoni mutuali exclusivi terminali, așa cum am menționat mai sus, matisarea poate evidenția situsuri alternative de poliadenilare (precum în cazul genei pentru calcitonină și CGRP prezentat anterior). Numeroase gene conțin însă la nivelul regiunii lor 3'UTR, în același exon, două sau mai multe semnale de poliadenilare și, ca urmare, pot suferi procese de adenilare alternativă, cu specificitate tisulară. Acest tip de poliadenilarea alternativă determină modificări în durata de viață a ARNm și, în această situație, proteina codificată este identică însă cantitatea produsă este diferită.

3.3. *Modificarea structurii primare a ARNm („RNA editing")*

„Editarea" ARN este o formă rară de procesare post-transcripțională a ARNm în care se produc modificări enzimatice specifice (substituția, inserția sau deleția) unui nucleotid. În felul acesta, același ARNm, în țesuturi diferite, poate suferi o modificare a secvenței, producând proteine diferite prin lungimea lor. La om au fost descrise: *editarea C → U* (în gena pentru apolipoproteina B sau genei *NF1* ce codifică neurofibrina), *editarea A → I (Inositol)*[56] (în gena ce codifică glutamina), *editarea U → C* (în gena WT1). Spre exemplu, ARNm pentru **apolipoproteina** B produce în ficat Apo-B100 și în intestinul subțire o proteină mai mică, Apo-B48, care are o secvență de aminoacizi identică cu prima parte a Apo-B100; explicația acestei translații diferite este „simplă": în intestin, prin editarea C → U a nucleotidului 6666 din ARNm, codonul CAA ce codifică glutamina este înlocuit cu un codon stop UAA. Ca urmare, molecula de ARNm codifică în aceste condiții o proteină mai scurtă, ApoB48.

3.4. *Modificarea stabilității (duratei de viață) și stocajului ARNm*

Intensitatea sintezei unei proteine depinde de cantitatea de ARNm corespunzător, iar aceasta, de *durata lui de viață*. De exemplu, ARNm produs de oncogenele *c-MYC* sau *c-FOS* are o stabilitate anormal crescută și determină o sinteză excesivă a proteinelor corespunzătoare, care intensifică proliferarea celulară. *Creșterea stabilității* este determinată de lungimea secvenței poliadenilice din regiunea 3' a ARNm. Un alt exemplu: sinteza de *histone* este intensă în timpul replicării ADN și foarte scăzută în alte momente din viața celulei; acest fenomen este rezultatul modificării stabilității ARNm pentru histone.

Stocajul post-transcripțional al moleculelor de ARNm în nucleu sau în citoplasmă și distribuția/disponibilitatea lor în momentul translației este cert o modalitate de reglare a sintezei proteinelor. De exemplu, unii stimuli hormonali pot produce o intensificare rapidă a sintezei de proteine prin eliberarea ARNm deja stocat și nu prin stimularea

54. Elementele *cis*-activatoare (*splicing enhancers*) sau *cis*-inhibitoare ale matisării (*splicing silencers*) pot fi localizare fie în intronul ce va fi matisat (*intronic splicing enhancer*, ISE, sau *intronic splicing silencer*, ISS), fie într-un exon vecin (*exonic splicing enhancer*, ESE, sau *exonic splicing silencers*, ESS).
55. Elementele *trans*-activatoare ale matisării sunt proteine din familia SR care au capacitatea de a se fixa la secvențele ISE sau ESE. Elementele *trans*-inhibitoare ale matisării sunt ribonucleoproteinele nucleare heterogene (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*, hnRNP) și proteinele ce se fixează în regiunile cu repetiții de pirimidine (*polypyrimidine tract binding protein*, PTB).
56. Editarea A → I este cea mai frecventă formă de editare întâlnită la mamifere și om. Ea poate interesa ARNm, ARNt, elemente repetitive (în special din familia *Alu*) și precursori ai ARNmi.

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

transcripției. Mecanismele prin care se decide și se realizează stocarea anumitor mesageri nu sunt cunoscute.

4. Reglarea translațională

4.1. Reglarea translațională prin fenomenul de interferență a ARN (rolul ARNmi)

Interferența ARN (RNAi) este un mecanism folosit de celule în apărarea contra genelor parazite (virusuri sau transpozoni) și pentru *reglarea post-transcripțională* a expresiei genelor, mai ales în cursul dezvoltării (Andrew Fire și Craig Mello, Premiul Nobel, 2006). În acest fenomen, rolul central îl au două tipuri de molecule mici de ARN – **ARN micro (ARNmi)** și **ARN mic interferent (ARNsi)** – care se fixează specific pe alte molecule de ARN (endogen sau exogen) și represează expresia lor.

Interferența ARN este inițiată de ribonucleaza *Dicer* care clivează un precursor lung de ARN dublu catenar (**ARNdc**) în fragmente bicatenare scurte de 20-25 nucleotide numite ARNsi (când ARNdc este de origine exogenă sau provine din transpozoni) sau ARNmi (când ARNdc este de origine endogenă). Moleculele mici de ARN bicatenar sunt desfăcute apoi în monocatene de către o helicază; una dintre ele („*catena ghid*") va fi încorporată în ***complexul de inactivare RISC*** (*RNA-Induced Silencing Complex*), ce cuprinde și proteine catalitice (din familia *Argonaute*); ARNsi sau ARNmi din complexul RISC se fixează prin complementaritate pe alte molecule de ARN (de exemplu, ARNm) și induc degradarea lui sau blocarea translației. Interferența ARN intervine și în organizarea heterocromatinei în genom, prin complexele **RITS** (*RNA-Induced Transcriptional Silencing*) ce participă la metilarea histonelor și ADN (figura 4.27). ARNsi și ARNmi folosesc aceeași mașinărie de procesare; diferența dintre acțiunile lor este că ARNmi se împerechează *incomplet* cu ARN țintă și inhibă translația mai multor molecule de ARN cu secvență relativ asemănătoare, în timp ce ARNsi realizează o împerechere *perfectă* și se fixează pe o singură țintă.

ARNmi (micro) formează o familie mare de molecule de ARN (cu lungime medie de 22 nucleotide), puternic conservată în evoluție. La mamifere și om, au fost descrise peste 1.000 de molecule de ARNmi, multe dintre acestea fiind exprimate numai în anumite tipuri de celule sau în anumite etape ale dezvoltării[57]). ARNmi este codificat de către gene[58] de sine stătătoare (adeseori organizate în tandem) sau sunt incluse în introni[59] unor gene ce codifică proteine (acestea din urmă sunt numite și **mirtroni**).

ARNmi recunoaște și se fixează pe o serie de secvențe-țintă care sunt localizate în special în regiunea 3'UTR a ARNm. Hibridul ARNm-ARNmi este încorporat în structura **complexului miRISC** (*miRNA-induced silencing complex*) care determină atenuarea translației[59] prin câteva mecanisme alternative: deadenilarea ARNm sau inhibarea asamblării ribozomului sau degradarea ARNm (figura 4.27).

Fiecare ARNmi are capacitatea de a recunoaște și modula translația a câtorva sute sau chiar mii de molecule ARNm, controlând împreună activitatea a circa 60% din toate genele care codifică proteine. În plus, o moleculă de ARNm este de regulă ținta mai multor molecule de ARNmi. Efectele unei molecule de ARNmi asupra nivelului unei proteine sunt în general mici: cel mai adesea cantitatea de proteină este redusă cu mai puțin de 50%. De aceea se consideră că acest mecanism de reglare este important în special pentru reglarea de finețe a expresiei genice.

Alterări ale activității ARNmi au fost descrise în cancer (vezi capitolul 18), precum și în alte boli (s-au descris circa 70 de „*boli asociate cu ARNmi*"). O atenție deosebită se acordă, în prezent, *polimorfismelor micro ARN* – ce interesează genele ce codifică moleculele de ARNmi (influențând biogeneza lor) sau situsurile de fixarea ale ARNmi (din regiunea 3'UTR a genei). Aceste polimorfisme sunt implicate în etiopatogenia unor anomalii congenitale sau a unor boli comune (cardiovasculare, neurodegenerative, cancer); efectele sunt însă mult mai subtile (fenotipuri „mai blânde" decât cele produse de mutația genelor pentru proteine) și deci mai greu de identificat. Efectul represiv al moleculelor de ARNmi ar putea fi folosit și în terapia antivirală (HIV, hepatite), tratamentul unor boli neurodegenerative (de exemplu, boala Huntington) sau cancer.

57. ARNmi reglează activitatea multor gene ce produc factori de transcripție implicați în morfogeneză; există dovezi care arată că ARNmi joacă un rol important în procese biologice „cheie", cum ar fi diferențierea tisulară, proliferarea celulelor, apoptoza, semnalizarea celulară care intervin în dezvoltarea embrionară (vezi capitolul 15.A.3).
58. Se estimează că 1-4% din genele genomului uman produc ARNmi.
59. ARNmi a fost implicat, paradoxal, și în activarea transcripției prin fixarea la promotorul genelor și demetilarea histonelor.

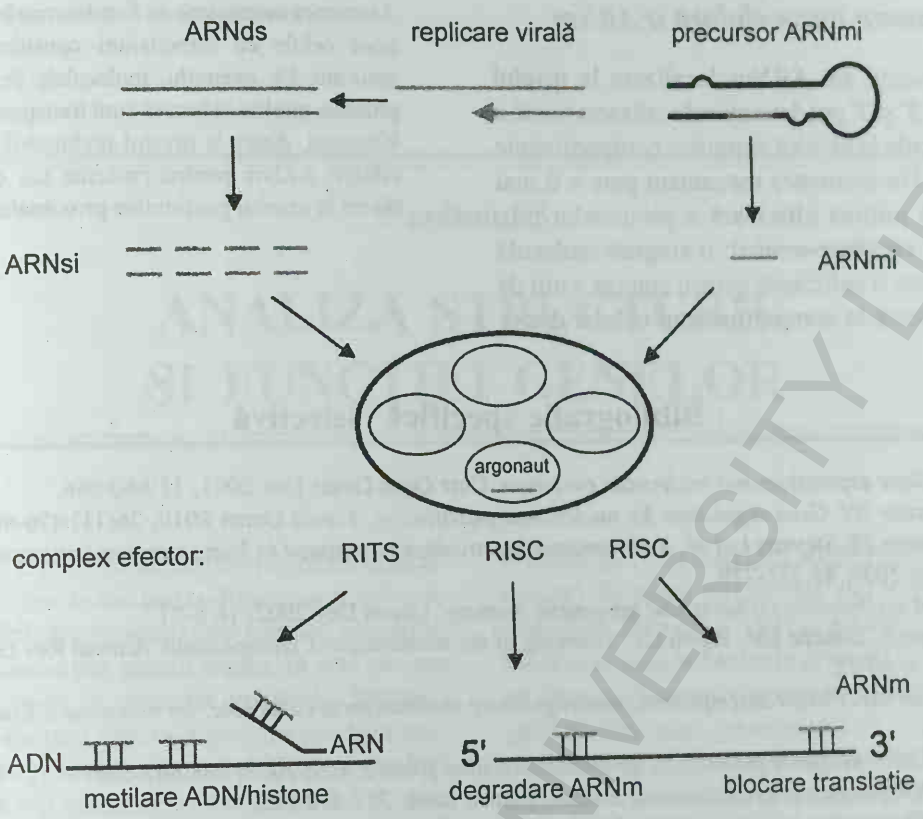


Figura 4.27. Formarea și acțiunea ARNsi și ARNmi
(după Wikipedia, 2010)

4.2. *Reglarea translațională prin degradarea moleculelor de ARNm cu mutații nonsens*

Reglarea translațională prin degradarea moleculelor de ARNm cu mutații nonsens (*nonsense-mediated mRNA decay*) este un mecanism de reglare translațională ce a fost evidențiat inițial ca un mecanism de control al calității ARNm ce permite eliminarea moleculelor de ARNm ce conțin un codon stop precoce, evitând în acest fel sinteza de proteine trunchiate, ce pot interfera cu funcția normală a proteinei. Cercetări ulterioare au arătat însă că acest mecanism este implicat și în regularea cantității unor ARNm normali.

Apariția unui codon stop precoce poate fi produsă prin diferite mecanisme mutaționale: substituții, deleții sau duplicații ale unuia sau mai multor exoni, inserția de elemente transpozabile etc. Mai mult însă, formarea de ARNm ce conțin codoni stop prematuri este un fenomen normal în cursul matisării alternative căci aproximativ 30% din moleculele de ARNm rezultate conțin erori de matisare (retenție de introni, salturi de exoni) ce determină apariția unui codon stop precoce.

Mecanismele prin care este realizată recunoașterea moleculelor de ARNm cu un codon stop precoce sunt complexe și încă incomplet cunoscute. Prezența unui codon stop în amonte de o joncțiune exon-exon generată prin matisare sau creșterea distanței între codonul stop și situl de poliadenilare sunt parametri care participă la marcarea moleculei de ARNm ca „anormală" și la desemnarea ei ca țintă a degradării.

4.3. *Reglarea translațională ca răspuns la acțiunea unor factori externi*

Există cu certitudine o reglare translațională a sintezei de proteine, dar aceasta este puțin cunoscută. Probabil că unele mecanisme care produc acest tip de reglare influențează stocajul mesagerilor, descris mai sus. Alte mecanisme implică recunoașterea specifică a unor secvențe *cis*-reglatoare din regiunile netranslate 5'UTR sau 3'UTR din ARNm, de către anumite proteine *trans*-reglatoare sau *modularea activității unor factori de inițiere a translației*, precum IF-2 sau IF-4.

Cel mai cunoscut exemplu de reglare translațională este reglarea **sintezei de feritină** (proteină ce fixează și transportă Fe^{2+}) în funcție de nivelul fierului: creșterea nivelului de fier stimulează producția de feritină și invers. În regiunile 5'UTR și 3'UTR se găsește un element *cis-reglator* (în formă de „ac de păr"), numit **IRE** (de la *Iron Response Element*), pe care, în absența Fe^{2+}, se fixează o proteină ce oprește temporar sinteza pe matrița de ARN și o protejează.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4.4. Localizarea intracelulară a ARNm

Anumite secvenţe ale ARNm localizate la nivelul extremităţilor 5' şi 3' pot determina localizarea ţintită a acestor molecule la nivelul anumitor compartimente ale celulelor. Un asemenea mecanism pare a fi mai eficient decât ţintirea ulterioară a proteinelor prin ataşarea unor secvenţe-semnal: o singură moleculă de ARNm poate fi suficientă pentru sinteza a mii de molecule proteice în compartimentul celular dorit.

Asemenea mecanisme au fost descrise în special în cazul unor celule cu dimensiuni considerabile, precum neuronii. De exemplu, moleculele de ARNm pentru proteina mielinică bazică sunt transportate, cu ajutorul kinezinei, direct la nivelul prelungirilor oligodendrocitelor; ARNm pentru proteina *tau* este transportat direct la nivelul porţiunilor proximale ale axonilor.

Bibliografie specifică selectivă

1. Akashi H. *Gene expression and molecular evolution.* Curr Opin Genet Dev 2001; 11:660-666.
2. Bai L, Morozov AV. *Gene regulation by nucleosome positioning.* Trends Genet 2010; 26(11):476-483.
3. Berg IM, Laven JS, Stevens I *et al. X chromosme inactivation is initiated in human preimplantation embryos.* Am J Hum Genet 2009; 84:771-779.
4. Bird A. *DNA methylation patterns and epigenetic memory.* Genes Dev 2002; 16:6-21.
5. Chow JC, Yen Z, Ziesche SM, Rown CL. *Silencing of the mammalian X chromosome.* Annual Rev Genomics Hum Genet 2005; 6:69-72.
6. Day DA, Tuite MF. *Post-transcriptional gene regulatory mechanism in eukaryote: on overview.* J Endocrinol 1998; 157:361-371.
7. Dever TE. *Gene-specific regulation by general translation factors.* Cell 2002; 108:545-556.
8. Esteller M. *Epigenetics in evolution and disease.* Lancet 2008; 372:590-596.
9. Esteller M. *Epigenetics in cancer.* N Engl J Med 2009; 358:1148.
10. Farajollahi S, Maas S. *Molecular diversity through RNA editing: a balancing act.* Trends Genet 2010; 26:221-230.
11. Handel AE, Ebers GC, Ramagopalan S. *Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease.* Trends Mol Med 2009; 16:7-16.
12. Hannon GJ. *RNA interference.* Nature 2002; 418:244-251.
13. Heijmans BT, Tobi EW, Lumey LH, Slaghoom PE. *The epigenom – archive of the parental environment.* Epigenetics 2009; 4:1-6.
14. Hirose Y, Manley L. *RNA polymerase II and the integration of nuclear events.* Genes Develop 2000; 14:1415-1429.
15. Glukman PD, Hanson MA, Cooper PC, Thornburg KL. *Effect of in utero and early life conditions on adult health disease.* N Engl J Med 2008; 359:61-71.
16. Jenuwein T, Allis CD. *Translating the histone code.* Science 2001; 293:1074-1780.
17. Krol J, Loedige I, Filipowics W. *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay.* Nat Rev Genet 2010; 11:597-610.
18. Lange UC, Schneider R. *What an epigenome remembers.* Bioessays 2010; 32:659-668.
19. Law JA, Jacobsen SE. *Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals.* Nat Rev Genet 2010; 11:204-220.
20. Li E. *Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development.* Nat Rev Genet 2002; 3:662-673.
21. Licatalosi DD, Darnell RB. *RNA processing and its regulation: global insights into biological networks.* Nat Rev Genet 2010; 11:75-87.
22. Noonan JP, McCallion AS. *Genomics of long-range regulatory elements.* Annual Rev Genomics Hum Genet 2010; 11:1-23.
23. Roberts GC, Smith CW. *Alternative splicing: combinatorial output from the genome.* Curr Opin Chem Biol 2002; 6:375-383.
24. Talbert PB, Henikoff S. *Histone variants – ancient wrap artists of the epigenome.* Nat Rev Mol Cel Biol 2010; 11:264-275.
25. Zaidi SK *et al. Architectural epigenetics: mitotic retention of mammalian transcriptional regulatory information.* Mol Cell Biol 2010; 30:4758-4766.
26. Wain HM, Bruford EA, Lovering RC *et al. Guidelines for human gene nomenclature.* Genomics 2002; 79:464-470.
27. Waterlands RA. *Early environmental effects on epigenetic regulation in humans.* Epigenetics 2009; 4:523-525.
28. Weksberg R. *Imprinted genes and human disease.* Am J Med Genet Part C 2010; 154C:317-320.
29. ***. *RNA silencing.* Nature 2009; 457, no. 7228.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 5

ANALIZA STRUCTURII ŞI FUNCŢIEI GENELOR

Până în 1970 genele erau entităţi materiale inaccesibile analizei directe din cauza dimensiunilor foarte mici şi imposibilităţii obţinerii unei cantităţi suficiente de material genetic pur pentru studiu. În acel an s-au descoperit *enzimele de restricţie*, veritabile „bisturie" genetice, cu ajutorul cărora a devenit posibilă secţionarea ADN şi izolarea genelor. Ulterior au fost introduse alte noi tehnologii de studiu a ADN, care au făcut posibilă combinarea moleculelor de ADN de la diferite specii (ADN recombinant), precum şi clonarea (amplificarea) sau analiza genelor.

Termenul de **ADN recombinant** se referă la combinaţiile noi de ADN obţinute între anumite secvenţe de ADN uman (sau de la alte organisme) şi molecule de ADN bacterian (sau de la alte specii), capabile să se replice indefinit (formând *clone moleculare*) sau să exprime, într-o celulă gazdă, informaţia genetică pe care o conţin.

Tehnicile de ADN recombinant au inaugurat „era ingineriei moleculare" care a schimbat statutul geneticienilor, transformându-i din observatori în „manipulatori" de gene. Astfel, la începutul anilor 1980 au fost obţinute primele animale transgenice. În numai trei decenii, s-au obţinut rezultate extraordinare în descifrarea structurii şi funcţiei genelor şi genomului, culminând cu descifrarea secvenţei genomului uman (2001, 2004), precum şi în aplicarea noilor cunoştinţe în medicină (pentru depistarea, diagnosticul şi tratamentul bolilor), industria farmaceutică (obţinerea de proteine terapeutice şi noi vaccinuri), agricultură şi zootehnie (utilizarea unor biotehnologii în ameliorarea plantelor şi animalelor), biologie (studii privind evoluţia speciilor, originea şi diversitatea populaţiilor umane). Se poate afirma fără nici o rezervă că noile tehnologii de studiu a ADN au produs *o nouă şi importantă revoluţie în biologie şi medicină*, comparabilă cu descoperirea microscopului; medicina a devenit „moleculară" sau „genomică".

Tehnicile de studiu ale structurii şi/sau funcţiei genelor se bazează pe două metode fundamentale:

- **clonarea** unei gene/secvenţe de ADN pentru obţinerea unui număr mare de copii identice a secvenţei-ţintă de ADN;
- **detecţia** specifică şi analiza unei secvenţe de ADN sau ARN pe baza **hibridizării acizilor nucleici**.

În era postgenomică s-au adăugat alte câteva modalităţi majore de analiză a funcţiei genelor:

- **analiza expresiei genelor**, atât la nivel de ARN, cât şi la nivel de proteine;
- **manipularea genelor** (inactivarea sau modificarea selectivă a acestora);
- **analiza partenerilor moleculari** ai produşilor codificaţi de gene prin identificarea interacţiunilor proteină-proteină şi a interacţiunilor între proteine şi acizii nucleici.

Aceste metode au revoluţionat studiul structurii şi funcţiei genelor la om şi alte specii. Ele au stat la baza unor tehnici specifice care au evoluat constant ca performanţă, acurateţe şi randament. În acest capitol sunt prezentate *principiile de bază* ale acestor tehnologii şi principalele *metode de analiză* ale structurii şi funcţiei genelor.

A. Clonarea ADN

Clonarea ADN se bazează în esenţă pe multiple runde de replicare selectivă a ADN (realizate de ADN polimeraze), fie *in vivo* (*clonare celulară*), folosind mecanismul natural al replicării ADN, fie *in vitro* (*clonare acelulară*), bazată pe *reacţia de polimerizare în lanţ* (PCR).

BCU CLUJ - BIBLIOTECA UNIVERSITY LIBRARY

1. Clonarea ADN în celule

Clonarea ADN *in vivo* utilizează mecanismul natural de replicare al ADN în celule şi implică patru etape majore (figura 5.1):

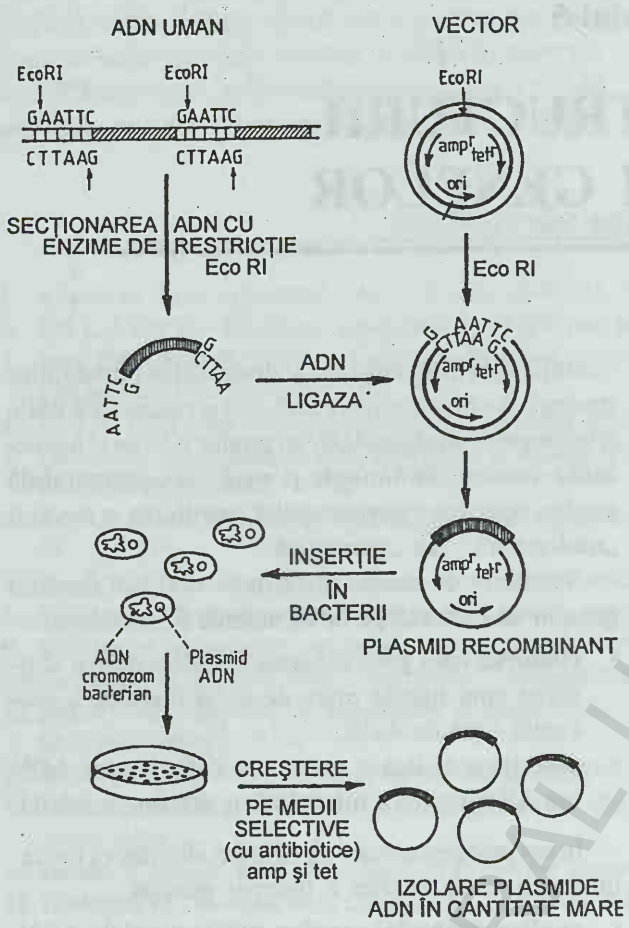


Figura 5.1. Clonarea unui fragment de ADN uman cu ajutorul unui plasmid introdus într-o celulă bacteriană

(modificat după Nussbaum *et al.*, 2001)

Eco RI – enzima de restricţie; „ori" – situsul de origine al replicării plasmidului; „amp" şi „tet" – gene ce conferă rezistenţa la ampicilina şi tetraciclina

- *obţinerea* unor gene sau fragmente de ADN uman şi *inserarea* lor în molecule vector (molecule de ADN capabile de replicare independentă); se formează astfel molecule de ADN hibrid numit **ADN recombinant**;
- *transferarea vectorilor recombinanţi în celule gazdă* (bacterii sau celule de drojdie) în care vectorul recombinant se replică independent de cromozomul celulei gazdă; acest proces se numeşte **transformare**; fiecare celulă gazdă fixează numai *un singur tip de ADN recombinant*;
- *amplificarea moleculelor de ADN recombinant* prin multiplicarea repetată în cultură a celulelor transformate; în acest proces vectorul recombinant se replică independent de cromozomul gazdei, dar folosind ADN polimeraza acesteia; prin diviziune se generează celule identice (clone celulare), care conţin fiecare acelaşi tip de vector recombinant;
- *separarea clonelor de ADN recombinant* prin oprirea culturilor şi *izolarea selectivă a ADN recombinant*.

Înainte de a descrie aceste etape vom sublinia că metoda clonării celulare a fost larg utilizată la începuturile perioadei tehnologiei ADN recombinant. Deşi este o metodă lentă şi laborioasă, clonarea celulară poate produce cantităţi mari de ADN clonat şi este metoda de elecţie pentru clonarea unor fragmente mari (până la cel mult 2 Mb), fabricarea băncilor de ADN şi studiul expresiei genelor. Pentru a secvenţia genomul uman a fost necesar să se cloneze în totalitate secvenţele genomice. S-au creat bănci cu clone de ADN genomic şi ADNc uman sau al unei serii de alte organisme care sunt puse la dispoziţia cercetătorilor care doresc să studieze o anumită clonă/secvenţă genomică. Clonarea celulară este din ce în ce mai puţin necesară în prezent, fiind folosită doar pentru analiza unor remanieri genomice patologice sau obţinerea ADNc care nu a fost încă izolat.

1.1. Obţinerea unor gene/fragmente de ADN

Pentru obţinerea unor fragmente de ADN în vederea amplificării şi analizei ulterioare, se pot folosi trei metode: secţionarea ADN genomic, cu ajutorul *enzimelor de restricţie* (metoda cea mai frecvent folosită); sintetizarea unei copii de ADN complementară unei molecule de ARN mesager (extras din citoplasmă), utilizându-se *transcriptaza inversă*; sinteza chimică artificială prin polimerizarea nucleotidelor după o secvenţă prestabilită, cu ajutorul *ADN polimerazei*.

a) Secţionarea ADN cu enzime de restricţie

Enzimele de restricţie[1] sunt *endonucleaze bacteriene* care secţionează ADN bicatenar, indiferent de originea sa, într-un mod *definit şi reproductibil* (totdeauna în aceleaşi locuri, formând fragmente de aceeaşi lungime).

Enzimele de restricţie sunt mijloace naturale de apărare ale unor bacterii contra infecţiilor cu virusuri (bacteriofagi), care invadează celulele bacteriene, se multiplică (folosind maşinăria moleculară a bacteriei)

1. Enzimele de restricţie au fost descoperite în 1970 de către Werner Arber, Daniel Nathans şi Hamilton Smith (Premiul Nobel, 1978).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 5.1. Exemple de enzime de restricţie şi situsuri de recunoaştere şi clivare
(adaptat după Gelherter şi Collins, 1998)

Enzima de restricţie*	Sursa	Situs de restricţie**
AluI	*Arthrobacter luteus*	5'AG↓CT3' 3'TC↑GA5'
BamHI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	G↓GATCC CCTAG↑G
EcoRI	*Escherichia coli* RY13	G↓AATTC CTTAA↑G
HaeIII	*Haemophilus aegipticus*	GG↓CC CC↑GG
HpaII	*Haemophilus parainfluenzae*	C↓CGG GGC↑C
MspI	*Moraxella sp.*	C↓CGG GGC↑C
NotI	*Nocardia otitidis*	GC↓GGCCGC CGCCGG↑CG
TaqI	*Thermus aquaticus*	T↓CGA AGC↑T

* Nomenclatura: prima literă=genul bacteriei; a doua literă şi eventual a treia=specia; ultima literă=suşa; o cifră = numărul de ordine.
** Săgeţile indică punctele în care catenele de ADN sunt tăiate.

şi le distrug (liză). Unele bacterii reuşesc să *limiteze* (în engleză, „*to restrict*") creşterea virusului infectant, printr-un proces în care ADN fagic este *recunoscut selectiv şi degradat enzimatic*, în timp ce ADN bacterian rămâne *protejat* de această acţiune distructivă[2].

Enzimele de restricţie (ER) nu secţionează ADN la întâmplare, ci *au un grad înalt de specificitate*: ele „scanează" ADN şi se opresc atunci când recunosc o secvenţă nucleotidică specifică, numită *situs de recunoaştere şi clivare* sau, pe scurt, **situs de restricţie**.

Situsul de restricţie este alcătuit de obicei din 4-6 perechi de baze (rareori 8 sau mai multe), dispuse în *palindrom* deci inversate (o catenă are secvenţa inversă a celeilalte catene; ambele catene „citite" în sensul 5'→3' au însă aceiaşi secvenţă) (tabel 5.1).

Enzimele de restricţie secţionează ambele catene ale moleculei de ADN fie la nivelul situsului (ER de tip II, cel mai frecvent folosite), fie lângă situsul de restricţie (ER de tip I sau III); ele sunt *endonucleaze* deoarece hidrolizează legăturile fosfodiester dintre nucleotide, totdeauna spre interiorul moleculei. Se folosesc câteva sute de enzime de restricţie, care diferă prin sursa bacteriană din care provin şi prin secvenţele nucleotidice pe care le recunosc şi pe care le clivează în ADN.

După modul în care secţionează ADN în situsul de restricţie, ER sunt de două feluri (tabelul 5.1): unele enzime (de exemplu *Eco*RI) realizează *secţiuni asimetrice* (decalate) ale catenelor şi produc fragmente care au *capetele „protruzive"*, cu o prelungire de 4 baze pe una din catene; aceste capete se mai numesc *„adezive"* (coezive) deoarece au tendinţa să se asocieze unul cu altul sau la o altă extremitate ce posedă o secvenţă complementară (figura 5.1); alte enzime (de exemplu *Hae* III) taie simetric (la acelaşi nivel) ambele catene şi produc capete *„drepte"*; ele nu se pot asocia spontan, ca în primul caz, ci numai sub acţiunea unor ADN ligaze. Există de asemeni enzime a căror activitate este inhibată de prezenţa metilării ADN (precum *Hpa* II sau *Not* I), sau care dimpotrivă, sunt capabile să secţioneze la nivelul situsului de restricţie indiferent dacă ADN-ul este metilat sau nu (de exemplu *Msp* I); aceste două categorii de enzime de restricţie se folosesc frecvent la studiul metilării patologice din anumite boli genetice.

Clivarea moleculei de ADN cu o anumită enzimă de restricţie „fragmentează" ADN într-un *număr definit, caracteristic şi reproductibil de fragmente*, care reflectă localizarea şi frecvenţa situsurilor specifice de clivare sau **harta de restricţie**. Situsurile de restricţie sunt dispuse la distanţe variate, iar fragmentele produse prin secţionare sunt de lungime inegală; pe această bază, ele pot fi uşor separate prin electroforeză.

2. Protecţia ADN bacterian este realizată de metiltransferaze bacteriene care recunosc, metilează şi protejează aceleaşi situsuri de restricţie recunoscute de către enzimele de restricţie proprii. De exemplu, *E. coli* RY13 produce metiltransferaza *Eco*RI care recunoaşte secvenţa GAATTC şi o metilează pe ambele catene la nivelul adeninei din poziţia centrală.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În acest context este util de subliniat un ultim aspect privind situsurile de restricție. Diferite mutații pot modifica (anula) situsul de restricție (care nu va mai fi recunoscut de enzimă) sau pot crea situsuri noi. De aceea clivarea ADN cu aceeași enzimă de restricție va produce la persoane diferite din populație fragmente de ADN cu lungimi diferite. Se realizează un amplu fenomen de ***„polimorfism al lungimii fragmentelor de restricție"*** (RFLP), care poate fi folosit ca un marker genetic prețios în *diagnosticul indirect* al unor boli genetice (vezi capitolul 10.B.2).

În afara acestor particularități trebuie să precizăm un lucru important: o anumită enzimă de restricție produce capete adezive *identice* atunci când secționează molecule de ADN *diferite* (figura 5.1). Datorită acestei caracteristici două fragmente de ADN cu origini diferite, dar produse de aceiași enzimă de restricție se pot uni pe bază de complementaritate producând *o moleculă hibridă de ADN recombinant*[3].

Enzimele de restricție au devenit instrumentul de bază al ingineriei genetice, „bisturiul" cu care se fac toate „operațiile moleculare" asupra ADN: corecții, amputații și mai ales „*transplante*" de gene.

b) Obținerea de ADN complementar

O altă metodă utilizată în scopul obținerii de gene folosește ca material de lucru *ARN mesager*, produsul (transcriptul) primar al genei, extras din citoplasma unei celule care îl sintetizează din abundență (de exemplu, ARNm pentru beta-globină izolat din hematii tinere). Molecula monocatenară de ARN mesager servește ca *matriță* pentru sinteza unei catene de **ADN complementar (ADNc)** realizată de enzima *transcriptază inversă*. Pe baza primei catene de ADN se sintetizează și cea de a doua catenă, complementară ei, obținându-se astfel o moleculă ADNc bicatenar care va corespunde genei (mai exact exonilor din genă, deoarece intronii au fost îndepărtați din ARNm matur) care în celulă a produs (prin transcripție) ARNm, ce a servit ca matriță pentru ADNc. În acest mod s-a sintetizat pentru prima dată gena pentru beta-globină.

c) Sinteza chimică, artificială, a unor fragmente de ADN

Metoda se bazează pe *polimerizarea dezoxiribonucleotidelor* ce alcătuiesc o catenă de ADN, într-o *ordine prestabilită/determinată anterior*. Ea se deduce pe baza secvenței de aminoacizi a proteinei codificată de genă, cu ajutorul codului genetic, care stabilește pentru fiecare aminoacid codonul (trinucleotidul) corespunzător. Alteori, secvența de nucleotide a genei/segmentului de ADN ce va fi sintetizat se stabilește prin alte metode. Această tehnică se folosește cu precădere pentru obținerea unor *oligonucleotide* corespunzătoare unei părți din genă, utilizate fie ca *sonde*, fie ca *amorse*, în alte tehnici de analiză moleculară.

1.2. Construcția moleculelor de ADN recombinant

După obținerea unor fragmente de ADN uman, analiza sau utilizarea genelor necesită *multiplicarea fragmentului* într-o cantitate suficientă. Pentru aceasta, genele se inseră într-un **vector** și cu ajutorul lui sunt introduse într-o **celulă gazdă** (bacterii, levuri etc.)[4], unde vor fi multiplicate. Deoarece vectorii pot forma prin replicare un număr mare de copii per celulă (folosind mașinăria de replicare a gazdei) și întrucât gazdele pot fi crescute indefinit în laborator se pot obține mari cantități din fragmentul de ADN inserat (genă).

Unirea a două fragmente de ADN de origini diferite produce o moleculă de **ADN recombinant**. Pentru aceasta, moleculele de ADN din cele două surse sunt secționate cu *aceeași enzimă de restricție*; se produc capete complementare identice care, fiind coezive, se pot uni pe bază de complementaritate și produc o moleculă hibridă de ADN recombinant (figura 5.1). Legăturile sunt stabilizate cu ajutorul unei *ADN ligaze*. Talia fragmentului exogen inserat depinde de tipul de vector.

a) Vectorii

Un vector este o moleculă naturală de ADN utilizată pentru *transportul* fragmentelor de ADN exogen (obținute cu enzime de restricție) într-o celulă gazdă. Vectorii sunt construiți în așa fel încât să permită introducerea *într-o poziție precisă* a fragmentului de ADN (*situs de clonare*). Vectorul este capabil să *se replice activ și independent* de genomul gazdei deoarece conține o *origine* de replicare (de aceea se mai numește și **replicon**). Vectorul mai conține o genă de rezistență la un antibiotic care facilitează selecția moleculelor hibride. Vectorul care include un fragment de ADN exogen se numește *vector recombinant*, iar procesul de încorporare a vectorilor recombinanți în celulele gazdă este numit ***transformare***. Cultura celulelor gazdă permite obținerea unei cantități importante de celule din care se poate izola în formă pură ADN recombinant.

Vectorii au fost folosiți în diverse scopuri: clonarea și amplificarea unei secvențe de ADN; studiul mecanismelor de expresie a genelor; introducerea de gene

3. Această moleculă hibridă, ce reunește segmente de ADN de la specii diferite, se mai numește și moleculă de **ADN „himerică"**.
4. Vectorii și celulele gazdă sunt *modificate* pentru a permite folosirea lor în tehnicile de clonare în siguranță deplină și pentru a diminua riscurile diseminării accidentale.

Tabel 5.2. Exemple de vectori folosiţi frecvent în clonarea moleculară
(adaptat după Thompson şi Thompson, 2001)

Vectori	Gazde	Tip ADN clonat	Mărimea fragmentului inserat
Plasmide şi vectori fagemid	bacterii, levuri	genomic, ADNc	până la 10 kb
Bacteriofagi lambda şi M13	bacterii	genomic, ADNc	până la 20 kb
Cosmide	bacterii	genomic	până la 50 kb
Cromozomi „artificiali" BAC, YAC şi PAC.	levuri	genomic	între 100-2.000 kb

în celule (**transfecţie**) sau organisme (**animale transgenice**); producţia de ARN şi mai ales de proteine terapeutice, pe baza genelor umane.

În tehnicile de clonare se utilizează frecvent patru tipuri principale de vectori, deosebiţi prin *mărimea fragmentelor de ADN exogen pe care-l pot insera*: plasmide, bacteriofagi, cosmide, cromozomi artificiali (tabelul 5.2).

(1) Plasmidele – se găsesc natural în bacterii, cărora le conferă rezistenţă la diferite antibiotice şi metale grele. Ele sunt alcătuite dintr-o moleculă mică (de circa 2-5 Kb) de ADN bicatenar circular extracromozomial, care se replică complet independent de cromozomul bacterian. Această moleculă prezintă un situs de iniţiere a replicării (origine) şi unul sau mai mulţi markeri de selecţie (de obicei gene care conferă rezistenţă la antibiotice). Ele au un situs unic de restricţie (situat într-o genă de „selecţie") unde poate fi inserat un fragment de ADN exogen (de la circa 1 Kb, până la maximum 10 kb), rezultând un *plasmid recombinant*. Principalul lor avantaj este eficienţa crescută de replicare, ce permite obţinerea unor cantităţi crescute de ADN recombinant.
(2) Bacteriofagii (sau pe scurt fagii) sunt virusuri care infectează şi distrug bacteriile. Ei posedă un sistem de *penetrare* în bacterie, în care îşi introduc ADN; se replică autonom, rapid şi intens (circa un milion de copii). Multiplicarea fagului în bacterie[5] conduce după un timp, la liza acesteia. În tehnicile de ADN recombinant se folosesc în special fagii lambda (λ) ce infectează *E. coli*. ADN fagic bicatenar şi liniar (figura 5.2), de aproximativ 45 Kb, este „împachetat" în capsula virusului.

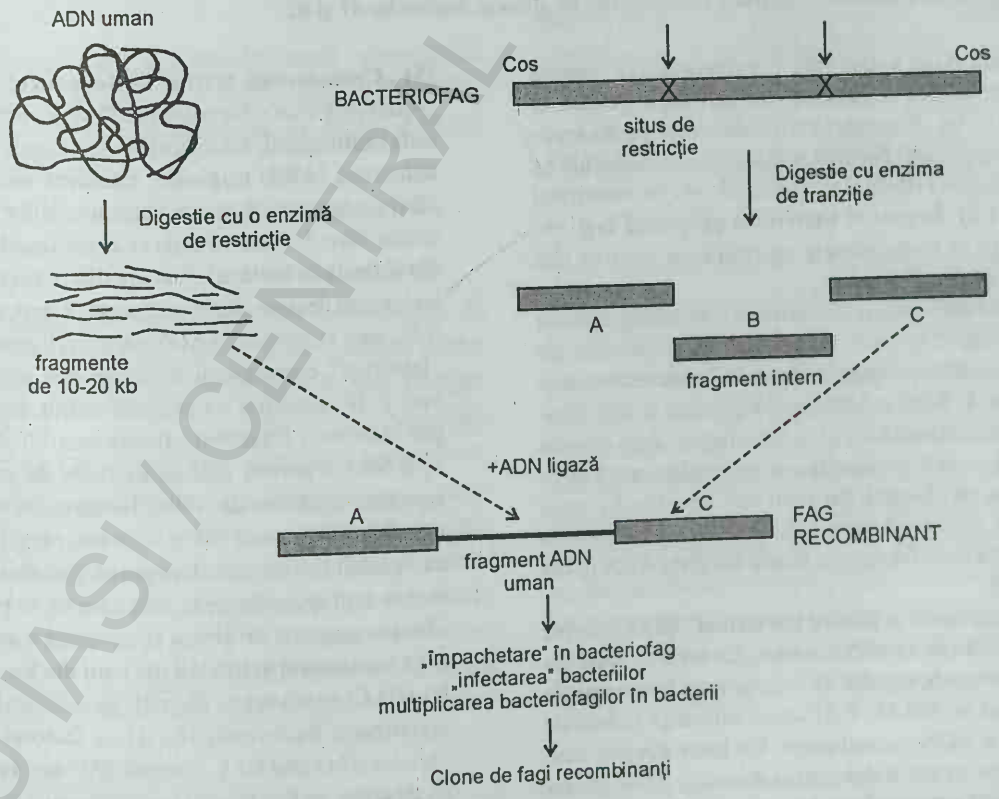


Figura 5.2. Clonarea unor fragmente de ADN genomic uman cu ajutorul unui vector de tip bacteriofag
(modificat după Nussbaum *et al.*, 2001)

5. Uneori fagii se pot insera în cromozomul bacterian, unde rămân „tăcuţi" (sub formă de *profagi*) şi se pot replica odată cu acesta (*ciclul lizogenic*).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

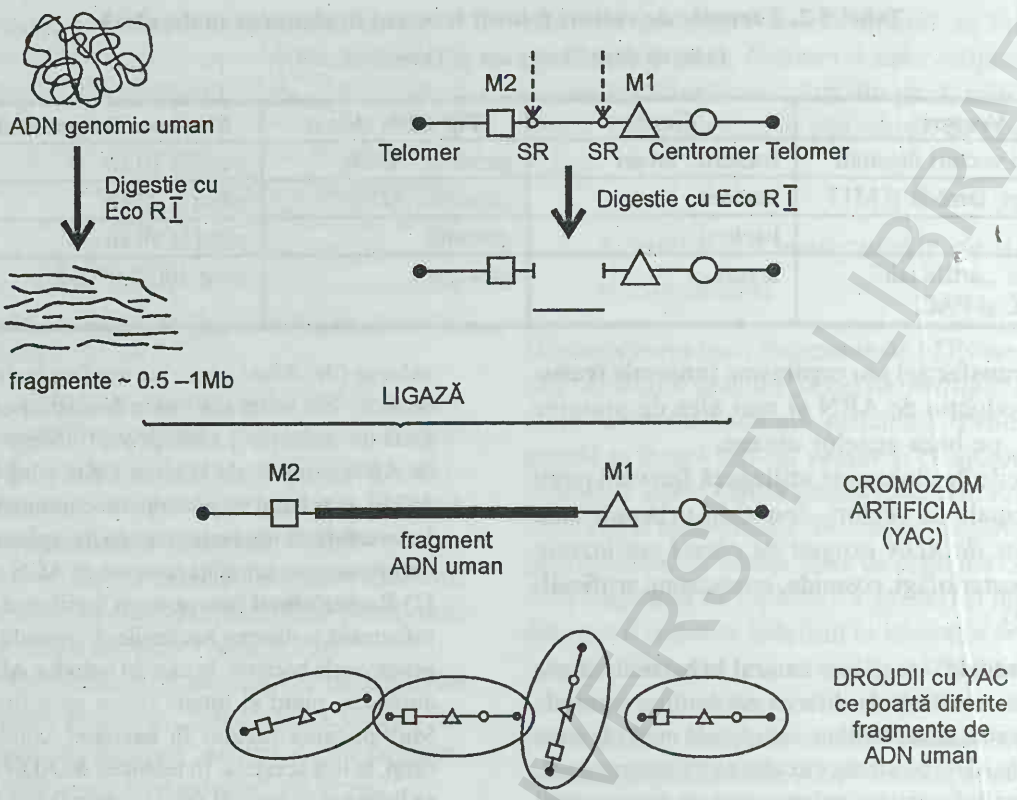


Figura 5.3. Construcția unei bănci/biblioteci de ADN genomic uman cu ajutorul cromzomilor artificiale de drojdii (YACs)

(modificat după Nussbaum *et al.*, 2001)

Drojdiile care încorporează YACs sunt selectate cu ajutorul markerilor #1 și #2

El posedă două extremități coezive/adezive, numite *cos* (care permit circularizarea ADN fagic pătruns în bacterie) și un „fragment intern", neesențial pentru replicare, care poate fi decupat și înlocuit cu o moleculă de ADN exogen (10-20 Kb), formând fagi recombinanți (figura 5.2). În culturi bacteriene pe geloză fagii recombinați se recunosc prin apariția unor plaje de liză ale „covorului" bacterian.

(3) Cosmidele sunt vectori artificiali constituiți dintr-un plasmid clasic la care s-au adăugat secvențele *cos* ale fagului lambda, secvențe care permit împachetarea unor segmente de ADN exogen mai lungi decât în fagi. Cosmidele funcționează inițial ca niște fagi și, după infecția bacteriei, acești pseudofagi se recircularizează și se replică ca un plasmid, dar mult mai lent, fiind și mult mai mari. Avantajul cosmidelor este că permit inserția și clonarea unor fragmente foarte lungi de ADN (până la 50 Kb).

(4) „Cromozomii artificiali bacterieni" (BAC) derivă din plasmidul de fertilitate numit „factor F", izolat din *E. coli*, care este capabil să încorporeze fragmente de ADN până la 300 kb. BAC au o eficiență redusă de replicare a ADN recombinant. Cu toate acestea sunt caracterizați printr-o stabilitate crescută a ADN inserat (rată minimă a mutațiilor); de aceea, BAC au fost tipul de vector cel mai larg folosit în cadrul proiectului Genom Uman.

(5) „Cromozomii artificiali de levuri" (YAC de la *„yeast artificial chromosomes"*) sunt vectori care posedă centromerul, telomerele și secvențele de replicare autonomă (ARS) originale, elemente necesare replicării și segregării mitotice a cromozomilor în cele două celule fiice de *Saccharomyces cereviseae* (levură/drojdia folosită în brutării). Fiecare dintre aceste elemente au lungimi de doar câteva sute de pb; în rest, cromatidele YAC sunt alcătuite din ADN exogen (figura 5.3). După „fabricare", cromozomii artificiali sunt introduși în levuri și se comportă ca și cromozomii normali. YAC pot încorpora fragmente foarte mari de ADN (până la 2 Mb) și permit replicarea ADN de eucariote cu secvențe repetitive de ADN. Totuși unele gene umane au mărimi de peste 2 Mb și în aceste cazuri analiza lor cu vectorii convenționali necesită clonarea unor fragmente suprapuse de genă, din care să se reconstituie ulterior secvența originală și integrală a genei.

(6) Cromozomii artificiali derivați din bacteriofagul P1 (PAC) sunt vectori obținuți pe cale artificială prin combinarea bacteriofagului P1 cu factorul F de la *E. coli*. Ca și în cazul BAC, vectorii PAC sunt foarte stabili și, de aceea, au fost folosiți în câteva proiecte de secvențiere a genomurilor unor organisme[6].

(7) Alți vectori. În afara de *vectorii de clonare*, în cazuri speciale, se folosesc și alte tipuri de vectori.

6. Recent a început fabricarea cromozomilor artificiali de mamifere (MAC) sau de om (HAC) ce vor fi utilizați pentru transferul de ADN în culturi de celule umane (de exemplu în terapia genică).

Vectorii navetă, pot introduce o secvenţă de ADN în celulele procariote sau eucariote (**transfecţie**), care ulterior va fi recuperată prin clonare într-o bacterie, în scopul studierii modificărilor pe care le-a suferit în celula eucariotă. *Vectorii de expresie* sunt vectori ce conţin semnalele necesare transcripţiei în vecinătatea situsului de inserţie a ADN exogen. Aceşti vectori pot funcţiona în bacterii sau drojdii determinând sinteza proteinei corespunzătoare genei pe care o conţin. *Vectorii virali* (retrovirusurile, adenovirusurile, virusul SV40 şi virusurile de tip *Herpes*) sunt folosiţi în experienţele de încorporare a ADN în celulele eucariote.

1.3. Transformarea

Moleculele de ADN recombinant sunt *transferate* (încorporate) în *celule gazdă* (de obicei bacterii nepatogene modificate[7]) în care vectorii recombinanţi se vor replica *independent* (autonom) de cromozomul bacterian, formând mai multe exemplare identice. Introducerea unui vector într-o celulă bacteriană se numeşte **transformare.**

Procedura de inserţie este specifică fiecărui tip de vector (de exemplu, în cazul plasmidelor membrana bacteriilor va fi tratată special[8], iar în cazul fagilor, ADN recombinant va fi mai întâi „împachetat" în capsula virală).

Trebuie subliniat că o celulă gazdă *competentă* fixează numai o singură moleculă de ADN recombinant; fiecare celulă transformată va forma o clonă specifică (figura 5.1).

1.4. Amplificarea

Bacteriile transformate sunt supuse multiplicării. În cazul clonării cu vectori plasmidici celulele bacteriene sunt însămânţate pe suprafaţa unei plăci cu agar, unde cresc şi formează colonii sau clone (populaţii de celule identice, descendente dintr-o singură celulă) distincte. Apoi, coloniile sunt prelevate şi cultivate individual într-un flacon cu mediu lichid, unde se produce o nouă expansiune a numărului de celule (figura 5.1). Dacă celula iniţială conţinea un vector recombinant atunci – prin multiplicarea lui precum şi a celulelor ce-l conţin – se realizează o amplificare enormă a fragmentului de ADN ataşat vectorului.

1.5. Izolarea clonelor de ADN recombinant

Celulele care au încorporat vectorul recombinant se vor *selecta* pe baza unor caractere fenotipice particulare. Astfel, creşterea bacteriilor pe un mediu cu ampicilină selectează acele celule care conţin copii ale plasmidului (cu gena de rezistenţă la ampicilină inserată) ce conferă bacteriei rezistenţă la acest antibiotic (figura 5.1). Se formează o colonie de bacterii cu ADN recombinant. La fel, proliferarea fagilor într-o bacterie se traduce prin liza sa: pe culturi în geloză, recombinanţii nu se evidenţiază prin clone, ci prin plaje de liză, pe un „fond" de bacterii normale. Prezenţa ADN recombinant în structura vectorului este adeseori identificată pe baza inactivării inserţionale a unei gene. Un astfel de sistem este acela al beta-galactozidazei. Situsul de inserţie este situat în interiorul acestei gene din structura vectorului. Prezenţa ADN recombinant va determina inactivarea acestei gene şi, ca urmare, va aboli capacitatea celulelor bacteriene transformate de a converti galactoza într-o substanţă colorată în albastru. Există şi alte metode de *screening* şi selecţie a clonelor de ADN.

După selecţie, celulele sunt procesate pentru *a se extrage şi purifica clona de ADN recombinant*. Această procedură se va aplica pentru fiecare colonie bacteriană ce conţine un anumit fragment de ADN genomic. Rezultă o *colecţie* sau *o bancă (bibliotecă) de clone de ADN* („*DNA libraries*") din populaţia iniţială de fragmente de ADN.

1.6. Construcţia băncilor sau bibliotecilor de gene

După punerea la punct a metodelor de clonare moleculară a devenit necesară crearea unei *colecţii de clone de ADN recombinant*, care să conţină toate secvenţele provenite dintr-o anumită sursă: ADN genomic (nuclear) sau ADN complementar (ADNc). O astfel de colecţie se numeşte **bancă de gene**, în care se stochează fragmentele de ADN clonate sau **bibliotecă de gene** deoarece o anumită genă sau fragment de ADN pot fi obţinute pentru a fi studiate sau folosite asemenea unor cărţi într-o bibliotecă. S-au creat bănci cu clone de ADN genomic şi ADNc uman sau de la o serie de alte organisme, iar cercetătorii care doresc să studieze o anumită clonă/secvenţă o pot obţine.

7. Bacteriile sunt cel mai frecvent folosite în clonarea ADN datorită multiplicării rapide (timp de generaţie 20-30 minute), facilităţii de manevrare şi costului redus. Deşi nepatogene, bacteriile sunt modificate pentru a diminua riscurile diseminării accidentale. Cel mai des se utilizează *E. coli*, mai rar *Pseudomonas* şi *Bacillus subtilis*.
8. Membrana celulei bacteriene nu este în mod normal permeabilă pentru moleculele mari de ADN, dar poate deveni permeabilă după tratamentul cu ioni bivalenţi sau şocuri electrice scurte (electroporaţie) care formează pori în peretele celular, prin care pătrund plasmidele. Totuşi numai un mic procent de celule vor fi *competente*, deci capabile să încorporeze ADN din mediul extracelular. Atunci când o fac ele fixează numai o singură moleculă vector, deci numai un fragment de ADN.

BCU IAŞI CENTRALA LIBRARY

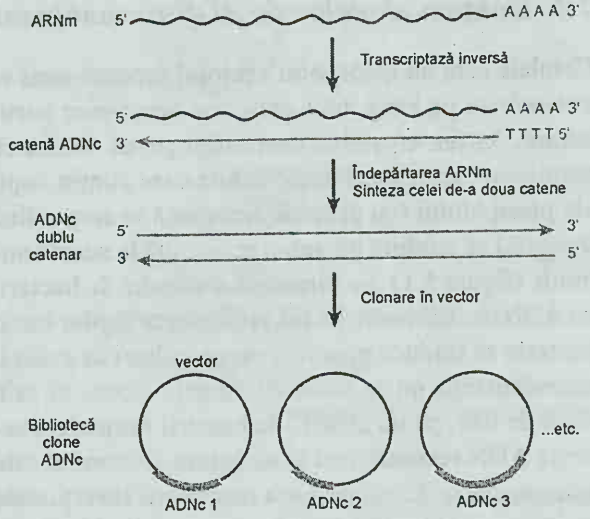


Figura 5.4. Construcția unei bănci/biblioteci de ADN genomic uman cu ajutorul unui vector de tip bacteriofag

(modificat după Nussbaum *et al.*, 2001)

Identificarea clonei cu gena dorită, din ansamblul clonelor din biblioteca sau banca de gene, se face cu ajutorul unor tehnici sensibile de identificare (*screening* sau triere), care utilizează fie sonde oligonucleotidice, fie anticorpi care evidențiază proteina codificată de gena cercetată.

a) Bănci (biblioteci) genomice

După extragerea ADN dintr-o celulă somatică (care conține de fapt informația genetică cuprinsă în genomul individului) se realizează fragmentarea sa prin digestia incompletă cu ajutorul unei anumite enzime de restricție, care produce fragmente de o anumită mărime. Aceste fragmente sunt inserate separat într-un vector tip bacteriofag lambda (figura 5.2) sau în plasmide (mai rar în cosmide sau YAC) (figura 5.3). Se obține o bancă cu sute de mii de vectori recombinanți ce conțin fragmente diferite de ADN uman. O astfel de colecție va cuprinde tot ADN din genomul uman.

b) Bănci (biblioteci) de ADN complementar (ADNc)

Banca de ADNc cuprinde copiile de ADNc ce corespund tuturor moleculelor de ARN mesager dintr-un anumit tip celular. Construcția unei bănci de ADNc se face în mai multe etape (figura 5.4). Mai întâi se obține ARN total din celulă și apoi se separă ARNm de celelalte tipuri de ARN. Cu ajutorul transcriptazei inverse se produc copii de ADNc corespunzătoare fiecărui molecule de ARNm care se inseră în vectori; fiecare vector va conține un fragment diferit de ADN și astfel se obține o colecție (bancă) de vectori cu ADNc.

Băncile de ADNc sunt folosite mai frecvent decât cele de ADN genomic deoarece clonele obținute corespund numai secvențelor codante ale genei (fără introni), deci sunt mult mai scurte. În plus se pot identifica mai ușor genele care se exprimă preferențial sau exclusiv în celule specializate (ficat, mușchi, reticulocite) sau în diferite perioade ale dezvoltării ontogenetice (embrion, făt, adult).

1.7. Sisteme de clonare pentru expresia genică

Sistemele de clonare descrise mai sus sunt destinate pur și simplu amplificării ADN țintă în scopul obținerii unor cantități suficiente pentru studiile de analiză structurală și funcțională. Există însă numeroase circumstanțe în care este necesară expresia genei clonate (fie obținerea de ARN, dar mai ales a proteinei) în celule bacteriene sau eucariote. Această **clonare de expresie** poate fi utilizată pentru studiul structurii proteinelor sau pentru obținerea de proteine (recombinante) folosite în scop terapeutic.

2. Clonarea acelulară a ADN (tehnica PCR)

În anul 1985, în analiza genotipică s-a produs o nouă mini-revoluție metodologică prin introducerea tehnicii bazată pe reacția de polimerizare în lanț („*polymerase chain reaction*"; PCR) (Kary B. Mullis și Michael Smith, Premiul Nobel pentru Chimie, 1993). Cu această metodă se poate amplifica selectiv o secvență scurtă de ADN sau ARN, a cărei structură nucleotidică este *parțial cunoscută*. Amplificarea este *considerabilă* (de miliarde de ori) și *rapidă* (în câteva ore), permițând obținerea unei *cantități suficiente* de material genetic necesare pentru analiză.

Amplificarea *in vitro* a unui fragment de ADN sau ARN se realizează pe baza *principiului extensiei unei amorse* („*primer*" sau „*amplimer*"). Tehnica folosește două oligonucleotide de sinteză care reproduc o secvență de 15-25 nucleotide situate la capătul 3' a celor două catene ale segmentului de ADN (figura 5.5); ele sunt numite **amorse** deoarece declanșează sinteza de ADN, după „matrița" fragmentului de ADN inițial (de amplificat); reacția necesită, evident, prezența ADN-polimerazei.

Într-un prim timp, segmentul de ADN ce trebuie amplificat este *denaturat termic* (la 95°C), obținându-se un amestec de fragmente monocatenare. Apoi, în al doilea timp, se produce (la 50-60°C) *poziționarea și hibridizarea amorselor* la secvențele complementare (situate în poziția 3') de pe fiecare catenă. După aceea, în a treia etapă are loc *polimerizarea* nucleotidelor sub acțiunea unei ADN-polimeraze termostabile[9] (la 72°C) și fiecare amorsă este *alungită*

9. Este vorba de Taq-polimeraza izolată din bacteria *Termophilus aquvaticus*, care crește natural în izvoarele termale și este stabilă la temperaturi ridicate.

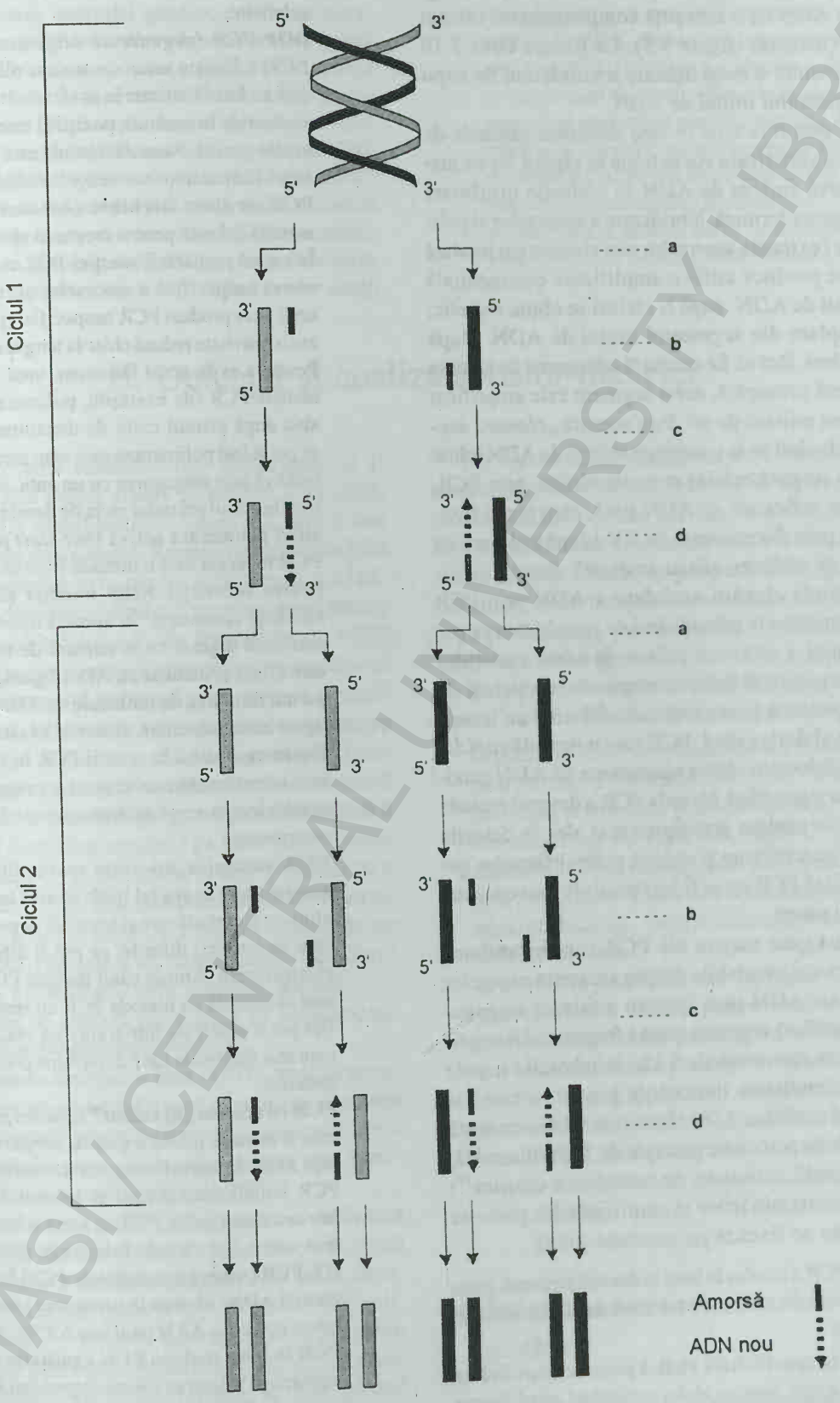


Figura 5.5. Etapele reacţiei de polimerizare în lanţ – PCR (polymerase chain reaction)
(modificat după Friedman *et al.*, 1992)

a. Denaturarea termică (90°) separă catenele ADN ţintă; b. Poziţionarea şi hibridarea amorselor (37°) la capetele 3 ale fiecărei catene; c. Polimerizarea nucleotidelor (Taq-polimerază, 70°) şi extensia amorselor

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(extinsă) în sensul 5' → 3', sintetizându-se un fragment de ADN cu o secvență complementară catenei copiate (matriță) (figura 5.5). La fiecare circa 3-10 minute rezultă o nouă dublare a numărului de copii ale segmentului inițial de ADN.

PCR este o *reacție în lanț* deoarece catenele de ADN nou sintetizate vor acționa la rândul lor ca matrițe pentru sinteza de ADN în ciclurile următoare de denaturare termică, hibridizare a amorselor și polimerizare (extensia amorselor sau sinteza enzimatică ADN); se produce astfel o amplificare exponențială a cantității de ADN: după N cicluri se obțin, teoretic, 2^N exemplare din segmentul inițial de ADN. După 30 de cicluri, fără să fie necesară adăugarea de amorse sau enzimă proaspătă, acest segment este amplificat de circa un miliard de ori. Prin această „*clonare acelulară*", plecând de la o cantitate infimă de ADN (chiar și de la o singură celulă) se poate obține, prin PCR, o cantitate suficientă de ADN-țintă, care poate fi vizualizată prin fluorescență în UV (după colorare cu bromură de etidium) și/sau analizată direct.

Avantajele clonării acelulare a ADN prin PCR sunt determinate în primul rând de *simplitatea* sa (nu necesită nici o altă manipulare, în afara variațiilor termice necesare diferitelor etape ale reacției, și de aceea se pretează la automatizare, folosind un *termociclor*); în al doilea rând, PCR este o metodă *rapidă, sensibilă* (folosește câteva nanograme de ADN genomic), *eficace și ieftină*. Metoda PCR a devenit metoda de elecție în analiza genotipică mai ales în detecția mutațiilor punctiforme și studiul polimorfismelor genotipice. Fără PCR nu ar fi fost posibilă secvențierea genomului uman.

Dezavantajele majore ale PCR sunt necesitatea unor informații prealabile despre secvența capetelor terminale ale ADN-țintă (pentru a fabrica oligonucleotide specifice), mărimea mică a fragmentului amplificat (rareori mai mare de 5 kb, în tehnicile uzuale de PCR)[10], cantitatea limitată de produs, precum și infidelitatea replicării ADN (frecvența relativ crescută a erorilor de împerechere generate de Taq polimerază, care nu posedă activitate de corecție a erorilor[11]) sau riscul contaminărilor și amplificărilor parazite (amorsele nu se fixează pe secvența-țintă).

Metoda PCR a condus în timp la dezvoltarea unei game largi de variante care au fost dezvoltate pentru aplicații specifice:

- **PCR cu specificitate alelică** permite amplificarea ADN a unei singure alele, excluzând amplificarea celeilalte. Această aplicație presupune obținerea unor amorse care se împerechează perfect la capătul lor 3' cu secvența ADN a unei alele, dar nu și a celeilalte.
- **DOP-PCR** (*degenerate oligonucleotide-primed PCR*) folosește seturi de amorse oligonucleotidice care au fost sintetizate în așa fel încât să aibă aceleași nucleotide în anumite poziții și nucleotide diferite în alte poziții. Această metodă este folosită pentru amplificarea unor secvențe înrudite de ADN.
- **PCR cu start fierbinte** (*hot-start PCR*) este o metodă folosită pentru creșterea specificității PCR. În cursul preparării reacției PCR este posibilă alinierea nespecifică a amorselor și inițierea producerii unor produși PCR nespecifici (polimeraza Taq are o activitate redusă chiar la temperatura camerei). Pentru a evita acest fenomen, unul dintre componentele PCR (de exemplu, polimeraza) se adaugă abia după primul ciclu de denaturare. Alternativ, se pot folosi polimeraze care sunt menținute în stare inactivă prin conjugarea cu un anticorp ce este inactivat în cursul primului ciclu de denaturare, eliberând astfel polimeraza activă (*hot-start polymerase*).
- **PCR inversat** este o metodă folosită pentru identificarea secvenței ADN imediat adiacente unei secvențe cunoscute. În această metodă ADN este mai întâi digerat cu o enzimă de restricție, apoi este diluat și incubat cu ADN ligază, condiții care permit formarea de molecule de ADN circular prin ligare intramoleculară. Acest ADN circular este apoi folosit ca matriță în reacții PCR în care amorsele sunt orientate către exteriorul secvenței cunoscute, conducând la amplificarea secvențelor adiacente, necunoscute.
- **PCR multiplex** folosește mai multe perechi de amorse alese în așa fel încât să aibă temperaturi de aliniere asemănătoare și totodată să producă amplicon cu lungimi diferite, ce pot fi diferențiați prin electroforeză. Atunci când metoda PCR multiplex este combinată cu metoda PCR cu specificitate alelică pot fi analizate într-o singură reacție mutațiile cele mai frecvente care determină o anumită boală genetică.
- **PCR cu amorse „în cuibar"** („*nested primer PCR*") este o metodă folosită pentru creșterea specificității PCR. În această metodă produșii unei reacții PCR inițiale sunt diluați și folosiți drept matriță într-o a doua reacție PCR cu amorse localizate imediat intern față de cele folosite în prima reacție.
- **RT-PCR** (*reverse transcriptase PCR*) folosește drept matriță ADNc obținut în urma unei reacții de transcriere inversă a ARN total sau ARNm poliadenilat.
- **PCR în timp real** sau **PCR cantitativ** (***Q-PCR***) se bazează pe folosirea unor componenți fluorescenți în reacția PCR și a unor termocicloare care permit măsurarea fluorescenței produsului PCR în cadrul fiecărui ciclu de amplificare (vezi și subcapitolul

10. Cu varianta „*long-range PCR*" produsul amplificat poate ajunge la peste 30 kb.
11. Alte polimeraze, precum *Pfu* extrasă de la *Pyrococcus furiosus* posedă activitate exonuclează 3'-5', ceea ce reduce semnificativ rata erorilor.

5.C.1). Principalele aplicaţii ale acestei metode sunt: cuantificarea expresiei genelor, detectarea mutaţiilor sau a polimorfismelor mononucleotidice (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs) şi măsurarea abundenţei unor secvenţe ADN sau ARN în produse clinice (de exemplu, în monitorizarea evoluţiei infecţiei cu virusul HIV sau cu virusul hepatitei B).

– **PCR digital** este o metodă folosită în cazul cuantificării absolute sau relative a numărului de molecule de ADN în eşantioane cu concentraţie foarte redusă, situaţie în care metoda Q-PCR nu poate fi folosită. Această metodă se bazează pe utilizarea unor diluţii importante de ADN realizate în aşa fel încât amestecul de reacţie va conţine fie o singură moleculă matrice de ADN, fie niciuna (ce corespunde deci unei amplificări pozitive sau negative). Efectuând un număr mare de reacţii diferite, în paralel cu reacţii control, şi prelucrând statistic numărul de reacţii pozitive şi negative, putem determina numărul de molecule de ADN din eşantionul iniţial. Tehnica poate fi realizată în placă multigodeuri (96 sau 384 godeuri) sau în emulsie (ca în cazul preparării matricelor pentru secvenţierea masivă paralelă a ADN).

B. Detecţia şi analiza acizilor nucleici

Analiza relaţiei fundamentale dintre genotip şi fenotip s-a bazat multă vreme pe analiza fenotipică, deci pe studiul manifestărilor genei sau explorarea produselor sale de expresie. Recent a devenit posibilă **analiza genotipică** prin explorarea directă a ADN.

Pentru a identifica şi studia o genă/secvenţă dintr-o colecţie (bancă/bibliotecă) de fragmente de ADN clonate sau pentru a pune *diagnosticul molecular* al unei boli la o anumită persoană este necesară o *sondă genotipică* adecvată care să permită recunoaşterea directă a genei sau a unor markeri genotipici (secvenţe necodante) situaţi în vecinătatea genei. Această recunoaştere se bazează pe principiul **hibridizării moleculare** a acizilor nucleici pe baza complementarităţii. Sonda de acid nucleic (oligonucleotid cu o secvenţă cunoscută), marcată (radioactiv sau fluorescent) se va fixa pe *bază de complementaritate* pe secvenţa-ţintă (formând un heteroduplex/un hibrid molecular), evidenţiabil prin marcajul sondei.

Strategiile de analiză genotipică au evoluat constant, în trei perioade/faze distincte.

(1) **Perioada Southern blot** (1975): analiza genelor cu sonde care se hibridizează specific pe regiunea genomică; metodă laborioasă şi neautomatizabilă este tributară posesiei unor *sonde adecvate* şi a unei *cantităţi suficiente* din proba analizabilă[12].

(2) **Introducerea PCR** (1985) a permis realizarea unei veritabile clonări moleculare *in vitro*, rezolvând problema obţinerii de sonde şi amplificării ţintei; devenind automatizabilă (prin folosirea unor ADN polimeraze termo-rezistente), metoda PCR a accelerat secvenţierea genelor şi explorarea genomului uman. Metodele bazate pe PCR (descrise în subcapitolul precedent) sunt însă dependente de cunoaşterea parţială a secvenţei ţintei şi de existenţa amorselor adecvate.

(3) **Secvenţierea genomului**. PGU, lansat în 1990, a accelerat dezvoltarea tehnicilor de secvenţiere şi a realizat în 2001 prima versiune a genomului uman cu 3 miliarde de nucleotide, finisată în 2004. S-a rezolvat problema amorselor pentru analiza genotipică, devenind astfel posibilă elaborarea unor noi tehnologii performante, automatizabile, destinate determinării variantelor genomice, normale sau patologice.

Deşi prezintă numeroase dificultăţi, analiza genotipică[13] are o valoare teoretică şi practică deosebită.

- În planul *cercetărilor fundamentale* analiza genotipică permite: studiul structurii genei; determinarea secvenţei şi structurii genomului uman; elucidarea mecanismelor de expresie genică şi în special a modalităţilor de reglaj, cheia unor procese biologice fundamentale: diferenţierea celulară, morfogeneza, senescenţa, funcţia sistemului nervos sau a sistemului imun.
- În *medicina practică* (vezi capitolul 9.B) analiza genotipică este folosită pentru: studiul patologiei moleculare produsă de mutaţiile ADN, indiferent dacă este vorba de o patologie ereditară (boli genetice) sau somatică (cancere); diagnosticul genotipic prenatal sau presimptomatic al unor boli chiar şi atunci când gena şi efectele ei nu sunt cunoscute sau nu sunt evidente; recunoaşterea unei infecţii virale latente.

1. Hibridizarea moleculară a acizilor nucleici

Hibridizarea se bazează pe capacitatea unor *molecule monocatenare* de acid nucleic de a forma, *pe bază de complementaritate*, molecule *bicatenare*.

12. Mai mult de 5 µg de ADN genomic, extras din circa un milion de celule.
13. Prezentarea va fi sintetică, punând accent pe principii şi nu pe detalii tehnice (pentru care recomandăm bibliografia).

Fragment ADN:

...TTATACG GT CATCG TCGCATGCTAG

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

ATGC*C*AGTA GC*AGC*

Sondă oligonucleotidică marcată cu ^{32}P(*) fixat la nucleotidul dCTP

Tehnicile standard folosesc o **sondă** monocatenară de acid nucleic (oligonucleotid cu o structură definită), pentru a identifica o secvență similară într-un amestec complex și heterogen de molecule de acid nucleic *„țintă"* (de obicei *imobilizat* pe un suport solid). Dacă ținta este o moleculă de ADN dublu-catenară, atunci catenele trebuie mai întâi *separate/denaturate* (prin căldură sau tratament alcalin). În condiții adecvate, sonda (vezi caseta 5.1) se fixează specific și stabil pe secvența sa complementară din proba test sau țintă formând un heteroduplex[14]. Pentru a identifica și izola hibridul molecular, *sonda este marcată* cu un trasor radioactiv sau cu un compus fluorescent. Prin detecția semnalului se va identifica secvența/gena ce posedă o secvență ADN omoloagă sondei folosite. Fenomenul este de *o specificitate extraordinară*, pentru că o sondă este capabilă să recunoască o secvență unică printre milioane de alte secvențe.

CASETA 5.1

Tipuri de sonde folosite pentru hibridizarea acizilor nucleici

Sondele folosite în tehnicile de hibridizare ale acizilor nucleici sunt de trei tipuri: ADN, ARN și oligonucleotide sintetice. ***Sondele ADN*** *sunt obținute de regulă prin metode de clonare celulară sau prin amplificare PCR. Ele sunt inițial dublu catenare și au lungimi între 0,1 kb și sute de kb.* ***Sondele ARN*** *(ribosonde) sunt molecule de ARN monocatenare cu lungimi de sute de pb până la câteva kb obținute prin clonarea unor fragmente ADN în plasmide de expresie ce conțin un promotor fagic (precum cei ai fagilor SP6, T3 sau T7).* ***Sondele oligonucleotidice*** *sunt fragmente monocatenare de ADN foarte scurte (de regulă 15-50 nucleotide) generate prin sinteză chimică.*

Pentru a permite vizualizarea heteroduplexului sondă-țintă, sondele trebuie marcate. ***Marcarea sondelor*** *poate fi obținută cu produși radioactivi* ***(sonde calde)*** *sau cu produși fluorescenți* ***(sonde reci).*** ***Radioizotopii*** *cei mai folosiți sunt P^{32} (cel mai utilizat în tehnicile de Southern blot și Northern blot, are timp de înjumătățire de 14,3 zile, necesită timp de expunere scurt pentru vizualizarea heteroduplexului, dar rezoluția spațială este slabă, datorită dispersiei semnalului) și S^{35} (folosit în special pentru hibridizarea* in situ, *are timp de înjumătățire de 87,4 zile, necesită timp de expunere mai lung, iar rezoluția spațială este mai bună).* ***Fluorocromii*** *sunt compuși chimici care absorb energia la o lungime de undă specifică și o reemit la o lungime de undă mai mare, dar caracteristică. Cei mai folosiți fluorocromi pentru marcarea sondelor sunt: AMCA (aminometilcumarină – albastru), DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol – albastru), FITC (fluorescein izotiocianat – verde), CY3 (indocarbocianină – roșu), TRITC (tetrametilrodamină izotiocianat – roșu), rodamina (roșu) și CY5 (indodicarbocianină – roșu).*

Marcarea sondelor este realizată prin câteva metode alternative. Sondele oligonucleotidice sunt marcate prin adiția unei singure grupări fosfat radioactive la capătul 5' al probei, reacție catalizată de o kinază. Sondele ADN și ARN sunt marcate prin încorporarea mai multor nucleotide modificate în cursul sintezei in vitro. *Există câteva metode alternative de încorporare a nucleotidelor modificate în sondele ADN sau ARN. Marcarea sondelor ADN bicatenare prin* ***translația rupturilor*** *(*nick translation*) constă în introducerea unor rupturi monocatenare cu ajutorul ADN-azei I care servesc apoi ca punct de plecare pentru ADN polimeraza I a bacteriei E. coli folosită pentru repararea acestor rupturi. ADN polimeraza I are atât activitate de ADN polimerază, cât și activitate de exonuclează 5'→3'. Ca urmare ea permite deplasarea continuă a punctului de ruptură în direcția 3' și încorporarea mai multor nucleotide modificate prezente în reacție. Marcarea sondelor cu* ***amorse aleatorii*** *(*random primed DNA labelling*) utilizează un amestec de hexanucleotide (toate variantele posibile) care se leagă pe bază de complementaritate la sonda ADN. Sinteza unei sonde complementare este catalizată de subunitatea Klenow a ADN polimerazei I de la E. coli (aceasta are doar activitate de polimerază, dar nu și de exonuclează 5'→3'). Marcarea poate fi realizată și prin* ***PCR*** *situație în care unul dintre nucleotide este marcat radioactiv sau fluorescent. Marcarea ribosondelor este obținută prin* ***transcripție*** **in vitro** *folosind ARN polimeraza corespunzătoare promotorului fagic al plasmidului în care este clonat fragmentul ADN și ribonucleotide marcate.*

14. Pentru a maximiza șansele formării heteroduplexului trebuie ca ținta să fie în exces față de sondă.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

2. Metode de hibridizare cu ţinta imobilizată

Eficienţa identificării heteroduplexurilor sondă-ţintă este foarte redusă în soluţii. De aceea, amestecul-ţintă de acizi nucleici este imobilizat pe un suport solid, precum o membrană de plastic sau o lamă de sticlă. Această formă de hibridizare stă la baza metodelor de analiză Southern blot, Northern blot şi a analizei cu sonde oligonucleotidice cu specificitate alelică prezentate mai jos.

2.1. Analiza ADN genomic prin metoda de transfer Southern

Obiectivul principal al metodei descrisă de Edwin Southern (1975) – cunoscută sub numele de **Southern blot** – este de a evidenţia, cu ajutorul unei sonde specifice *prezenţa sau absenţa unui fragment de ADN omolog* („*ţintă*"), obţinut prin fragmentarea ADN genomic cu o anumită enzimă de restricţie. Pentru aceasta, ADN extras din nucleii celulari este digerat cu una sau mai multe enzime de restricţie, fragmentele sunt separate după mărime prin electroforeză în gel de agaroză, denaturate şi apoi *transferate* (prin capilaritate/sugere – în engleză „*blotting*") şi imobilizate pe o membrană solidă de nitroceluloză, pentru a fi hibridizate cu o sondă monocatenară specifică, marcată radioactiv. Sonda se va fixa numai pe secvenţa complementară de ADN (dacă este prezentă), iar poziţia ei pe membrană va permite evaluarea fragmentului de ADN ce conţine sonda complementară.

Metoda Southern comportă următoarele etape (figura 5.6):

- *extragerea ADN genomic* dintr-o sursă accesibilă: limfocite din sângele periferic, celule din culturi de fibroblaşti, celule amniotice sau din vilozităţile coriale (pentru diagnosticul prenatal), celule obţinute prin biopsii de organe etc.;
- *fragmentarea ADN genomic* prin clivarea cu o enzimă de restricţie adecvată (sau un amestec de două enzime), pentru a obţine circa un milion de fragmente mai mici de 20kb; aceasta presupune cunoaşterea prealabilă a *hărţii situsurilor de restricţie* pentru regiunea genomică explorată şi alegerea celui mai adecvat *cuplu enzimă de restricţie – sondă*;
- *separarea fragmentelor*, pe baza mărimii lor prin electroforeză în gel de agaroză, în care fragmentele mai mici migrează mai repede decât cele mai mari; pentru separarea fragmentelor mari de ADN (de la 40 kb până la 2-3 Mb) se foloseşte electroforeza în câmp pulsatil;
- *denaturarea* fragmentelor bicatenare, pentru separarea celor două monocatene complementare; se

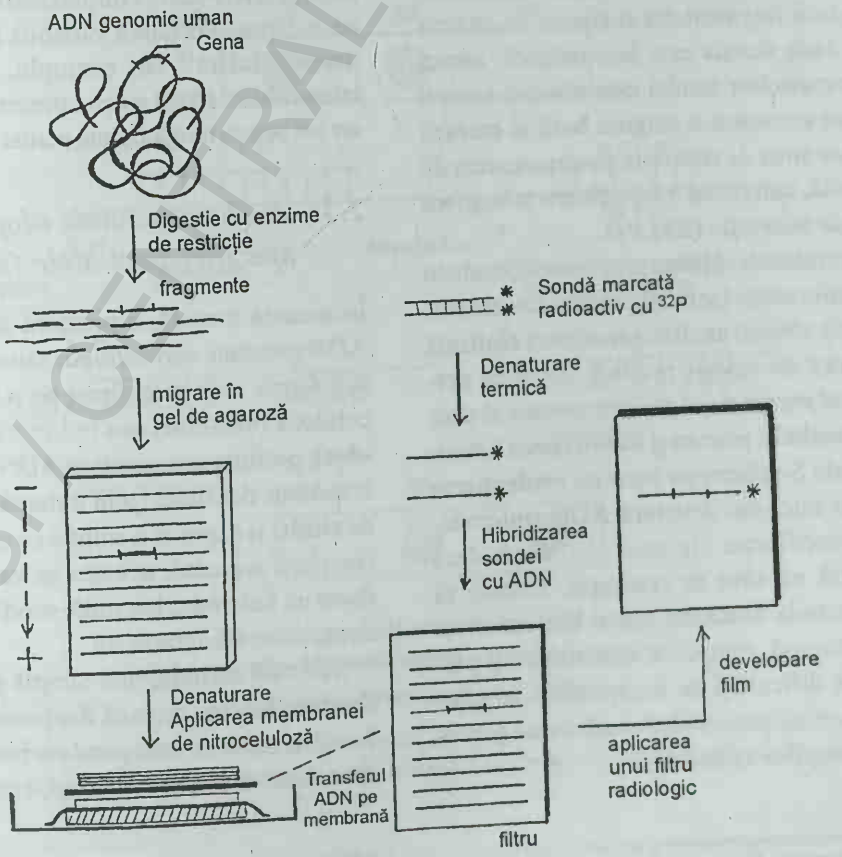


Figura 5.6. Tehnica Southern blot
(modificat după Mueller şi Young, 1998)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

realizează prin tratarea cu o soluție alcalină, de obicei de hidroxid de sodiu;

- *transferarea* moleculelor de ADN monocatenar din gelul de agaroză fragil pe un suport *solid* (filtru din nitroceluloză sau nailon), prin capilaritate sau sugere („blotting"); de aici derivă numele metodei „Southern blot" sau „Southern transfer"; fragmentele monocatenare de ADN vor fi *imobilizate* pe membrană în poziția în care s-au găsit, după migrare, în gel;
- *hibridizarea* fragmentelor ADN de pe filtru cu o sondă monocatenară *marcată* radioactiv specifică unei gene sau a unui marker genotipic; sonda se va împerechea/asocia numai cu secvența complementară dintr-unul sau două fragmente de ADN genomic;
- *spălarea:* heteroduplexul format între fragmentul de ADN și sondă este puternic fixat pe filtru și deci rezistent la o spălare intensă (care îndepărtează fragmentele nehibridizate de pe filtru);
- *punerea în evidență* a duplexului, printr-un semnal persistent, după contactul filtrului cu un film foto (autoradiografie), care relevă poziția și mărimea fragmentului.

Rezultatele obținute prin metoda Southern *se compară* apoi cu profilul normal al domeniului genomic explorat de sondă. Prin această metodă pot fi evidențiate două tipuri de mutații: *deleții sau inserții genice* mai mari de 50-100 pb: acestea determină modificarea lungimii fragmentelor realizate de enzima de restricție; dacă deleția este homozigotă, atunci semnalul corespunzător sondei este absent; *mutații punctiforme*, ce afectează o singură bază și creează sau anulează un situs de restricție pentru enzima de restricție folosită, antrenând *o modificare a lungimii fragmentelor de restricție* (RFLPs).

Cu toate că rezultatele obținute prin metoda Southern par reduse ca informație (semnal prezent sau absent; situs prezent sau absent) analiza genotipică realizată cu această tehnică are valoare practică, deoarece permite *diagnosticul prenatal sau presimptomatic* al unor mutații genice morbide, precum și *identificarea heterozigoților*. Metoda Southern nu permite evidențierea unor modificări mici din structura ADN (microdeleții, mutații punctiforme ale unei pb), decât dacă acestea afectează un situs de restricție. Trebuie să subliniem că metoda Southern are și alte inconveniente: este laborioasă, complexă, costisitoare și prezintă numeroase dificultăți de interpretare. În plus, laboratorul trebuie să posede dotări adecvate pentru manipularea izotopilor radioactivi.

2.2. *Analiza ARNm prin Northern blot*

Northern blot[15] este o variantă a metodei Southern blot în care acidul nucleic țintă este ARNm. Obiectivul principal al metodei este obținerea de informații privind *profilurile de expresie* (tipul celular, abundența transcriptului) unei anumite gene (deja clonată).

Punerea în evidență a unui anumit ARNm se bazează pe hibridizarea moleculară a ARN cu o sondă complementară monocatenară (ADNc denaturat; oligonucleotide ARN antisens).

> Moleculele de ARNm, de diferite lungimi (în funcție de gena transcrisă), extrase din diferite celule/țesuturi, sunt *separate* prin electroforeză în gel denaturant de agaroză (care suprimă structurile secundare ce ar afecta migrarea și hibridizarea). Apoi ele sunt *transferate* pe un filtru de nitroceluloză și *hibridizate* cu o sondă marcată. Pe *autoradiogramă* se observă una sau mai multe benzi ale căror talie, număr și intensitate sunt indicații prețioase. Absența unei benzi ce ar fi trebuit evidențiată de sondă ne indică faptul că gena nu este exprimată/transcrisă datorită unei mutații. Existența unei mutații (de exemplu, deleție) poate fi revelată printr-un fragment de ARNm cu talie anormală.

Analiza ARNm este mult mai delicată și mai dificilă decât cea a ADN deoarece: ARN este foarte vulnerabil la ARN-azele citoplasmatice; numeroase tipuri au o expresie celulară variabilă în funcție de diferențierea celulară[16] (de exemplu, ARNm pentru fenilalanin-hidroxilază nu este prezent decât în hepatocite, iar cel pentru tiroglobulină numai în celulele tiroidiene.

2.3. *Analiza cu sonde oligonucleotidice specifice unei alele (ASO)*

În această metodă, o picătură de soluție apoasă de ADN genomic *nefracționat* sau de ARN este depusă sub forma unor *pete* direct pe o membrană de nitroceluloză (**dot-blot**) sau indirect printr-o *fantă* (**slot-dot**); picătura este uscată și ADN imobilizat pe membrană este denaturat (prin tratarea filtrului cu o soluție de alcali) și expus la o soluție ce conține *sonda monocatenară marcată*; aceasta se va hibridiza, formându-se un heteroduplex țintă-sondă ce va fi pus în evidență autoradiografic.

Această metodă, mai simplă și mai rapidă decât Southern blot (nu necesită fracționarea ADN), folosește de obicei sonde ce corespund unei secvențe mici (20 pb), cunoscute, din structura genei, care cuprinde/acoperă

15. Metoda este denumită „Northern" (nordică) prin opoziție umoristică față de metoda descrisă de Edwin Southern („sudică") și, cu toate că nu este un nume propriu, prin analogie se recomandă scrierea cu majuscule.
16. ADN se poate analiza în orice tip de celule nucleate și toate genele sunt egal accesibile analizei.

BCU CLUJ / UNIVERSITY LIBRARY

situsul nucleotidic variant (sunt numite de aceea şi **sonde oligonucleotidice specifice – ASO**, de la „*Allele Specific Oligonucleotides*"). Duplexul dintre ADN ţintă şi sondă este stabil numai dacă complementaritatea bazelor este perfectă. Cu aceste sonde scurte, mult mai „sensibile" la alterările minime ale secvenţei genice, se pot depista modificări ale unei singure perechi de baze. De aceea, ele sunt folosite pentru depistarea unor *mutaţii specifice*, deja cunoscute într-o anumită boală genetică[17]. Cu alte cuvinte, se poate stabili dacă acea mutaţie este prezentă sau absentă într-o probă de ADN obţinut de la un pacient oarecare. Sensibilitatea sondelor ASO este evident superioară metodei Southern, care nu poate depista leziunile minime ale ADN decât în anumite circumstanţe.

Pentru depistarea unei mutaţii specifice se fabrică oligonucleotide specifice unei alele normale sau mutante. Mai exact, ele corespund regiunii genice unde au fost localizate diferenţe de secvenţă (mutaţii). Sonda corespunzătoare acestei regiuni este sintetizată în două versiuni: normală şi mutantă. *Versiunea normală* a sondei nu se poate hibridiza decât cu alela normală şi invers, *versiunea mutantă* se împerechează numai cu alela mutantă. Hibridizările încrucişate nu sunt stabile datorită împerecherii greşite („mismatch") între baze necomplementare (figura 5.7). Astfel se poate stabili dacă o mutaţie deja cunoscută, specifică unei boli, este prezentă sau absentă la o anumită persoană. Mai mult, se poate face deosebirea între un homozigot pentru alela normală (ADN-ul său hibridizează numai cu ASO normal), heterozigot (ADN său hibridizează cu ambele versiuni ASO) sau homozigot pentru secvenţa mutantă (ADN-ul său hibridizează numai cu ASO mutant).

Trebuie totuşi să subliniem că lipsa de hibridizare între versiunea ASO mutantă şi ADN pacientului nu înseamnă automat că aceasta este normal: el poate avea o altă mutaţie în genă, în altă regiune decât cea explorată printr-o anumită sondă ASO. Analiza ASO este utilă numai în cazurile în care există o mare probabilitate (bazată pe alte date) ca o familie sau un individ să posede o mutaţie cunoscută. Deci, tehnica se aplică în special pentru boli genetice caracterizate printr-un număr mic de mutaţii, precis definite (de exemplu, hemocromatoza, drepanocitoza).

2.4. *Hibridizarea* in situ *a cromozomilor*

O variantă de analiză a ADN des folosită în prezent este **hibridizarea *in situ*** pe preparate cromozomiale în pro-metafază[18] (şi chiar pe nuclei interfazici) folosind sonde marcate (de obicei cu molecule fluorescente – FISH sau CGH) judicios alese, în funcţie de

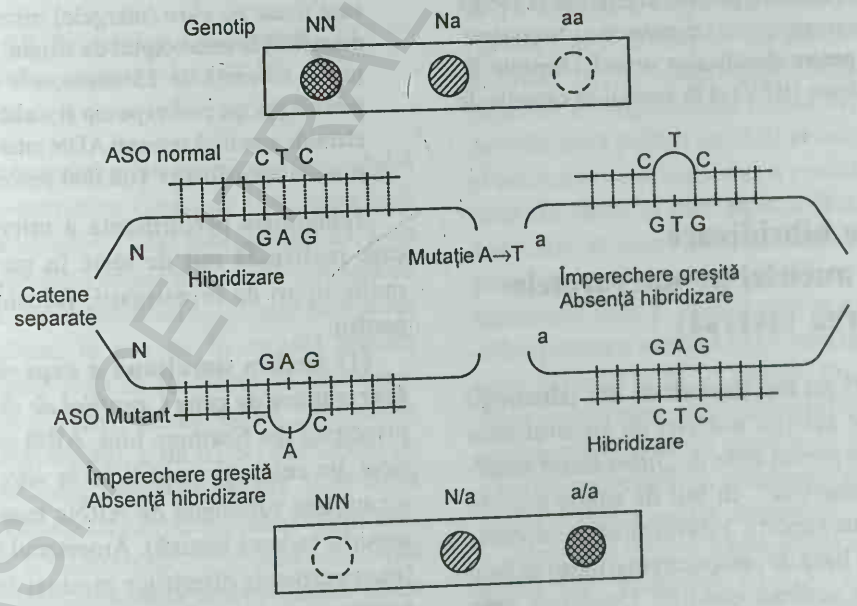


Figura 5.7. Depistarea unei mutaţii folosind sonde ASO (allele-specofic-oligonucleotid) normale şi mutante

(modificat după Nussbaum *et al.*, 2001)

Sonda normală va hibridiza stabil numai cu alela normală; hibridizarea cu alela mutantă este instabilă deoarece se produce o eroare de împerechere („*mismatch*"); sonda mutantă va avea hibrida stabil numai cu alela mutantă.

17. Există şi alte metode pentru detectarea mutaţiilor *necunoscute*: *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE), *mismatch cleavage*, *single-strand conformational polymorphism* (SSCP) care vor fi descrise în capitolul 9.
18. ADN cromozomial este purificat – prin îndepărtarea ARN cu o ARNază şi a proteinelor cu proteinaza K – şi denaturat *in situ* (prin tratament cu formamidă).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

obiectivul urmărit (vezi capitolul 2.D.3.a). Dacă se bănuieşte o microdeleţie pentru o anumită regiune cromozomială, la limita vizibilităţii microscopice, se utilizează o sondă marcată corespunzătoare genelor din regiunea respectivă; absenţa semnalului corespunzător sondei traduce deleţia regiunii. Dacă se urmăreşte localizarea unei gene se foloseşte o sondă tip ADNc pentru o genă omoloagă identificată deja la un animal de laborator.

2.5. *Identificarea ADN al organismelor exogene*

Orice infecţie sau infestare cu un microorganism bacterian, viral, fungic sau parazitar poate fi detectată într-un eşantion biologic prin hibridizare moleculară, dacă există sonde corespunzătoare genomului acestui organism. Hibridizarea moleculară oferă multiple avantaje faţă de metodele clasice: simplitate, rapiditate şi specificitate (perspective de automatizare), posibilitatea de a detecta agenţi infecţioşi dificil sau imposibil de cultivat *in vitro*, posibilitatea de depistare directă a unui agent patogen într-un amestec polimicrobian (în mijlocul unei flore comensale) şi pe orice tip de eşantion patologic.

În practică metodele de hibridizare moleculară au găsit deja importante aplicaţii pentru caracterizarea rapidă a germenilor cu creştere lentă (mycobacterii, treponeme, *Brucella* etc.), pentru identificarea virusului hepatitei B, virusului papiloma (HPV) şi în special în cazurile de SIDA (HIV).

3. Metode de hibridizare a acizilor nucleici pe microreţele (hibridizarea inversă)

Începând cu 1995 au fost dezvoltate noi tehnologii de hibridizare ale acizilor nucleici cu ajutorul unor microreţele[19] care permit teste de *„hibridizare simultană (paralelă) multiplă"*, cu mii de sonde diferite (imobilizate pe un suport); hibridizarea monocatenelor de ADN (pe bază de complementaritate) se face concomitent şi în aceleaşi condiţii. Deoarece, spre deosebire de hibridizarea standard, *sondele sunt nemarcate şi fixate pe un suport solid*, în timp ce populaţia-ţintă de acizi nucleici este marcată şi aflată într-o soluţie apoasă, metoda este cunoscută şi sub numele de **hibridizare inversă**.

Microreţelele sunt alcătuite din câteva mii de *sonde oligonucleotidice diferite* (fiecare fiind specifică pentru o anumită secvenţă ADN), *nemarcate*, fixate pe o lamă de sticlă sau pe un cip de silicon, în mici *puncte* (*„spots"*) cu coordonate precise, dispuse *în rânduri ordonate,* sub forma unei *reţele (grile)* cu înaltă densitate (**„cip ADN"**). În fiecare punct al reţelei se va fixa doar un singur tip de oligonucleotid. Proba test (*„ţintă"*) conţine o populaţie de fragmente de ADN, ADNc sau ARNc, în soluţie apoasă, denaturate şi marcate fluorescent, care vor fi hibridizate cu sondele moleculare fixate pe microreţea. După spălare (ce îndepărtează sondele nehibridizate) şi uscare, semnalele fluorescente ale hibrizilor din fiecare „poziţie/punct" al reţelei vor fi detectate cu un scanner laser de înaltă rezoluţie şi analizate cu un soft special de analiză digitală, care converteşte semnalul (fiecărui punct al reţelei), în funcţie de intensitate, într-o anumită culoare.

Microreţelele ADN diferă prin modul de fabricaţie (*„spotted microarrays"* – sonde gata sintetizate depuse/„spotted" pe sticlă; *„oligonucleotide arrays"* - oligonucleotidele sunt sintetizate, prin fotolitografie, *in situ* direct pe substratul de siliciu), prin modul de lucru, acurateţe, eficienţă şi cost. Microreţelele fabricate de Affymetrix conţin mai mult de 6 milioane oligonucleotide diferite *fixate direct* pe o suprafaţă sticlă de 1,7 cm^2; fiecare probă are o lungime de circa 25 nucleotide. În tehnologia Illumina oligonucleotidele sunt *fixate pe sfere* (mărgele) microscopice (3 μm în diametru) în microcipuri de siliciu. Fiecare probă conţine o secvenţă de 25 nucleotide care dă informaţii privind poziţia probei pe cip şi o altă secvenţă de 50 nucleotide specifică regiunii ADN interogate. Fiecare sferă conţine aproximativ 100.000 probe identice.

Tehnologia performantă a microreţelelor ADN, care realizează mii de teste în paralel, a accelerat multe tipuri de investigaţii, folosindu-se în special pentru:

(1) **analiza simultană a expresiei unui număr foarte mare de gene** (*„profilul de expresie"*) folosind principiul din Northern blot. ARN mesager este purificat din celule şi amplificat *in vitro* pentru a obţine o cantitate suficientă de ARNc marcat cu un epitop specific (adesea biotină). Amestecul de ARNc obţinut (ce corespunde diferiţilor produşi de transcripţie ale genelor exprimate în celulele analizate) este hibridizat pe o microreţea ce conţine sonde sintetizate *in situ* pentru fiecare din miile de genele umane cunoscute. Astfel poate fi determinat profilul de expresie (transcripţie) al unui tip celular sau al unui ţesut, util în stabilirea rolului diferitelor gene în procesul diferenţierii şi dezvoltării, precum în diferite stări patologice (de exemplu *„amprente"* sau *„semnături" moleculare*

19. Tehnologia microreţelelor a evoluat din Southern blot.

pentru diferite tipuri şi grade de tumori) şi pentru studiul acţiunii medicamentelor;

(2) **genotiparea**, folosind fie microreţele cu sonde polimorfice ce permit identificarea SNP, fie microreţele cu sonde non-polimorfice ce acoperă întregul genom şi permit identificarea variaţiilor numărului de copii (CNV – *copy number variation*); genotiparea permite determinarea variabilităţii ADN (inclusiv în medicina legală) şi diagnosticul mutaţiilor în gene cunoscute.

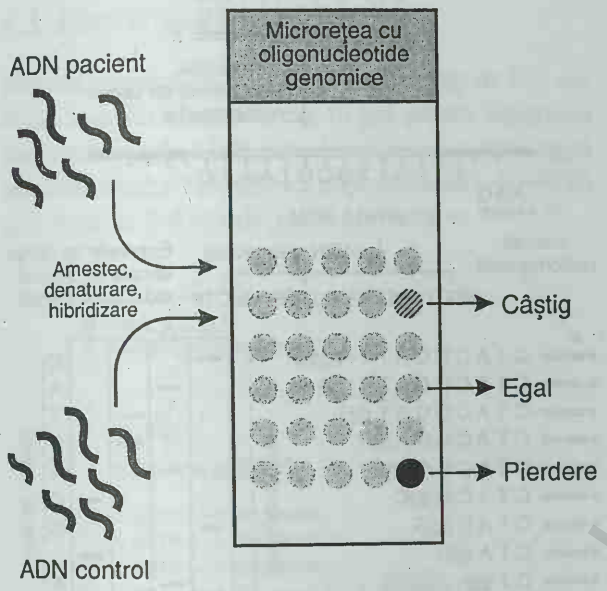


Figura 5.8. Principiul hibridizării genomice comparative (CGH)
(modificat după Nussbaum *et al.*, 2007)

(3) **analiza genomică prin tehnica microreţelei CGH** (*array Comparative Genomic Hybridization*) (sau „*cariotip molecular*"; vezi subcapitolul 2.C), cu cipuri de înaltă rezoluţie conţinând o suită continuă de sonde, de câteva zeci de nucleotide, plasate în ordinea în care ele se găsesc în genom. În această metodă comparativă (figura 5.8) se foloseşte un ADN test provenit de la un pacient, marcat cu un fluorocrom verde (gri haşurat în figură), şi un ADN (martor marcat cu un fluorocrom roşu, negru în figură). Cele două probe sunt amestecate în cantităţi egale şi apoi sunt cohibridizate pe o microreţea ce conţine un număr variabil de sonde oligonucleotidice monocatenare (între 44.000 şi 1.000.000). Măsurând raportul fluorescenţei roşu – verde emis de fiecare spot oligonucleotidic se poate calcula raportul dintre cantitatea de ADN corespunzătoare fragmentului de ADN cu secvenţă complementară sondei prezentă în proba test şi proba martor. Un semnal galben (gri în figură) indică prezenţa unui număr identic de copii ale regiunii respective la pacient, şi martor; un semnal verde (gri haşurat în figură) semnifică o *duplicaţie* a regiunii respective la pacient iar un semnal roşu (negru în figură) *o deleţie*. Astfel, *microreţelele CGH* permit identificarea fie a unor modificări de *dozaj genic* sub forma unor microdeleţii şi microduplicaţii la pacienţi cu anomalii congenitale multiple şi retard mintal, fie a *polimorfismelor numărului de copii (CNP)*.

Numărul de sonde utilizate în construirea microreţelelor poate fi foarte mare, realizându-se astfel o „reţea/plasă" strâns ordonată („*tiling array*") cu milioane de micro-spoturi ce conţin *sonde suprapuse*, care atunci când acoperă genomul în totalitate se numeşte ***whole genome array*** (**WGA**). Acest tip de microreţele poate fi utilizat pentru a realiza o analiză CGH cu o rezoluţie extrem de importantă, sau poate fi combinat cu imunoprecipitarea (tehnică numită ***ChIP-chip***) pentru studiul secvenţelor de ADN fixate la anumite proteine.

Noile tipuri de cipuri ADN, de generaţia a doua, permit analiza structurii genelor şi genotiparea, studiul expresiei genelor în condiţii normale (diferenţiere, dezvoltare) sau patologice (profilul de expresie în cancer), interacţiunile dintre proteinele cromatinei etc. Aplicarea acestei noi tehnologii în cercetările biomedicale şi diagnosticul genotipic va avea un impact major asupra medicinii.

4. Secvenţierea ADN

După izolarea şi amplificarea unui fragment de ADN (genă), etapa principală de analiză genotipică este determinarea secvenţei nucleotidice, deci a informaţiei genetice a fragmentului respectiv. Această acţiune este decisivă pentru a stabili *structura* genei precum şi secvenţa de aminoacizi a *proteinei* codificată de genă (în cazul în care ea nu a fost identificată). De asemenea se poate determina *tipul de mutaţie* care a produs o boală genetică. Stabilirea secvenţei nucleotidice este utilă şi pentru sinteza *oligosondelor specifice* pentru o alelă (ASO – vezi mai sus) şi a *amorselor* folosite în PCR, ambele fiind larg utilizate în diagnosticul molecular. Secvenţierea ADN a devenit indispensabilă pentru cercetările ştiinţifice – culminând cu secvenţierea genomului uman şi altor organisme –, dar şi pentru diagnostic sau biotehnologie.

Metodele pentru determinarea secvenţei nucleotidice a unor fragmente de ADN au fost descoperite (1970) independent de Walter Gilbert (tehnica de degradare chimică) şi Fred Sanger (tehnica de sinteză enzimatică), care în 1980 au primit împreună premiul Nobel pentru Chimie. Metoda cea mai folosită a fost *tehnica de sinteză enzimatică a lui Sanger* care foloseşte didezoxiribonucleotidele, ca „*terminatori*" de catenă nucleotid specifici, şi cromatografia bidimensională. Ulterior au fost dezvoltate tehnici de secvenţiere automată *bazate pe culoare* (fluorocromi), mult mai simple şi, mai ales, mai rapide şi au fost

inventate *pirosecvenţierea* (o tehnologie de secvenţiere a ADN complet diferită de metoda Sanger) şi *secvenţierea masivă paralelă* a unui număr enorm de fragmente diferite de ADN (tehnicile de sevenţiere de generaţia a doua şi a treia). Toate acestea au transformat radical genetica moleculară, aducând-o în zilele noastre la performanţe altădată de neimaginat.

4.1. Metoda de sinteză enzimatică (Sanger)

În această metodă se sintetizează o catenă nouă de ADN, complementară segmentului cu secvenţă necunoscută[20] (ce funcţionează ca matriţă), utilizând ADN-polimeraza şi o *amorsă* radiomarcată (fixată la extremitatea 3' a fragmentului). Reacţia poate fi inhibată (stopată) în dreptul unui anumit nucleotid, prin folosirea unor *analogi nucleotidici* de tipul didezoxinucleotidelor (ddNTP) (care au pierdut grupările 2'-OH şi 3'-OH). ADN *polimeraza* poate adăuga un astfel de nucleotid, dar, după ce acesta a fost încorporat, reacţia se opreşte datorită absenţei grupării 3'-OH din didezoxinucleotid, necesară polimerizării (catena sintetizată este „terminată" de ultimul ddNTP). Se realizează astfel fragmente cu o lungime egală distanţei dintre amorsă şi locul unde s-a încorporat un anumit didezoxinucleotid.

Molecula de ADN ce trebuie secvenţiată este mai întâi *separată* în cele două catene. Fiecare catenă este *clonată* într-un vector monocatenar (fagul M13), fiind *inserată* (cu capătul 3') într-un anumit situs, după o secvenţă („*primer*") cunoscută şi marcată radioactiv, ce are rolul de *amorsă* (figura 5.9). Aceste monocatene de ADN servesc ca *matriţă* pentru sinteza unei catene noi, complementare, folosind ADN polimeraza şi nucleotidele necesare sintezei. Reacţia se desfăşoară concomitent în *patru eprubete*, în fiecare se va stabili localizarea unui anumit nucleotid folosind ca analog inhibitor un anumit didezoxiribonucleotid.

De exemplu, în eprubeta ce va stabili localizarea G se va adăuga didzoxiribonucleotidul ddGTP; atunci când ddGTP este încorporat în catena în curs de formare, sinteza se opreşte. Când polimeraza întâlneşte următorul nucleotid G fenomenul se repetă şi rezultă fragmente cu 4 nucleotide şi respectiv 9 nucleotide[21] (figura 5.9). Se va produce astfel o colecţie de fragmente ADN de diferite lungimi, fiecare având la capătul terminal un anumit ddNTP. Aceste fragmente sunt separate prin migrare în gel de poliacrilamidă (cu o concentraţie crescută de uree pentru a menţine ADN monocatenar); se observă o serie de benzi la poziţii ce corespund localizării fiecărui nucleotid cu G. Reacţii similare pentru nucleotidele cu A, T şi C vor furniza serii corespunzătoare de fragmente (fiecare probă într-un anumit „canal" al gelului de poliacrilamidă). Ansamblul celor patru reacţii poate fi atunci citit pe o „scară" poziţională direcţionată de la fragmentele cele mai mici la cele mai mari; astfel se poate determina *secvenţa* de nucleotide a fragmentului analizat.

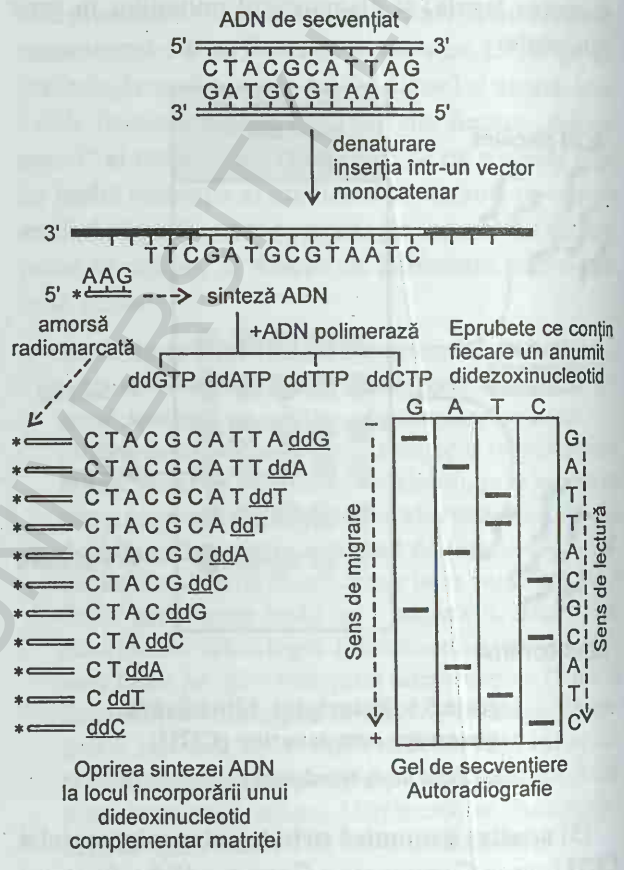


Figura 5.9. Metoda enzimatică Sanger pentru determinarea secvenţei nucleotidice a unui fragment de ADN

(modificat după Nussbaum *et al.*, 2001)

4.2. Secvenţierea prin terminatori ddNTP marcaţi fluorescent

Metoda de sinteză enzimatică descrisă de Sanger a fost perfecţionată continuu. Într-o etapă ulterioară a fost introdusă tehnica „*dye-terminator sequencing*" în care ddNTP terminatori ai catenei sunt marcaţi fluorescent, fapt ce permite secvenţierea într-o singură reacţie (comparativ cu patru reacţii în metoda ce foloseşte marcarea radioactivă a amorselor); fragmentele nou sintetizate migrează în gel printr-un *tub capilar de sticlă* lung şi extrem de subţire. La capătul

20. Fragmente de ADN sunt clonate în vectori sau produse prin amplificare PCR.

21. Cantităţile de nucleotide G normale şi analog G din această reacţie sunt astfel ajustate ca polimeraza să încorporeze analogul G în unele catene nou-sintetizate pentru prima oară când se încorporează G, în timp ce în alte catene analogul este încorporat a doua oară când se va încorpora G, în altele a treia oară ş.a.m.d.

capilarului o rază laser produce excitaţia fluorocromilor şi un monitor detectează semnalul fluorescent al fragmentului de ADN ce trece prin gel, iar computerul înregistrează şi stochează un profil distinct pentru fiecare fluorocrom colorat diferit, stabilind secvenţa nucleotidică determinată. Metoda de secvenţiere cu „terminatori marcaţi fluorescent" a permis realizarea secvenţiatoarelor automate cu „debit înalt" care cresc enorm viteza şi eficienţa procesului de secvenţiere şi scad costurile.

4.3. *Pirosecvenţierea iterativă*

Metoda „clasică" a ddNTP, folosită timp de trei decenii, implica electroforeza în gel pentru separarea fragmentelor de ADN nou sintetizate; această etapă este laborioasă şi face tehnica puţin eficientă (~30-60 kb per ciclu de 3-4 ore de electroforeză).

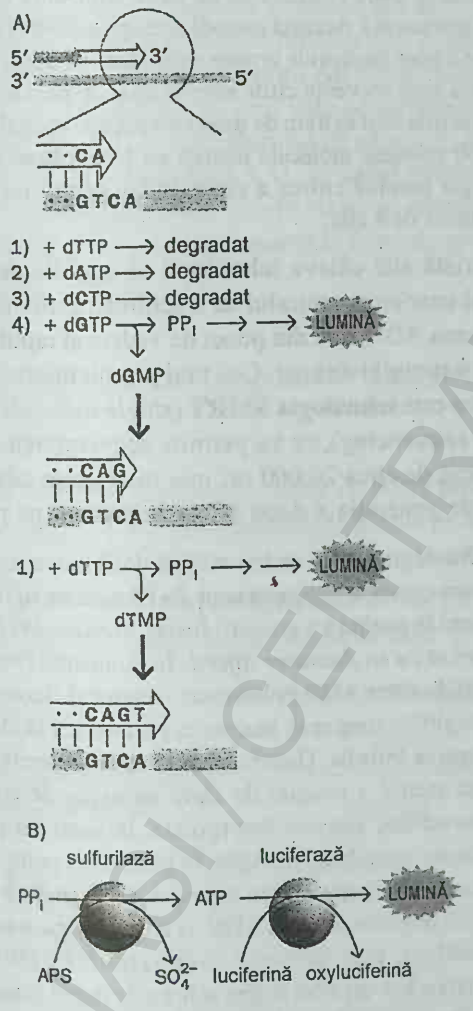


Figura 5.10. Principiul metodei de pirosecvenţiere iterativă
(modificat după Strachan şi Read, 2010)

În anul 2000 a fost introdusă *o tehnologie de secvenţiere a ADN complet diferită* care nu necesită electroforeză în gel şi care permite înregistrarea secvenţei de ADN pe măsură ce *un nou nucleotid este încorporat în catena nou sintetizată* de către ADN polimerază. Această metodă foloseşte o serie de reacţii succesive de **pirosecvenţiere** (figura 5.10): catenele noi de ADN sunt sintetizate de către o ADN polimerază, care foloseşte precursori dezoxinucleotid trifosfat (dNTP) şi o matriţă de ADN monocatenar. Cele patru tipuri de dNTP sunt furnizate secvenţial, nu toate odată; când este furnizat *dNTP corect*, complementar matriţei, ADN polimeraza îl încorporează sub formă de dNMP (dezoxinucleotid monofosfat) şi eliberează un grup pirofosfat (PPi). Urmează o serie de reacţii prin care se eliberează o cantitate de lumină vizibilă, detectată de o cameră CCD („*charge-coupled device*"), ce este proporţională cu cantitatea de ATP produsă. În cazul în care este furnizat un nucleotid incorect el este degradat de o enzimă (*apiraza*) şi nu se produce semnalul luminos (figura 5.10).

4.4. *Secvenţierea masivă paralelă*

Metoda de pirosecvenţiere iterativă a stat la baza *tehnologiilor de secvenţiere masivă paralelă (simultană) a ADN* de generaţia a doua (care folosesc PCR pentru amplificarea ADN-ţintă), disponibile în 2007 şi apoi a tehnicilor de secvenţiere de generaţia a treia (2008) care permit secvenţierea unei singure molecule de ADN fără să fie nevoie de amplificarea ei.

a) Secvenţierea masivă paralelă cu ADN amplificat

Primul val de tehnologii de secvenţiere bazate pe pirosecvenţiere utilizează PCR pentru amplificarea secvenţelor ADN-ţintă (în locul clonării) şi permit procesarea simultană a milioane de secvenţe (*tehnici de secvenţiere de generaţia a doua*[22]). Metoda pirosecvenţierii masive paralele permite citirea în paralel a câteva sute de mii de secvenţe, fiecare cu o lungime de 300-500 pb (în total >0.45 Gb pentru fiecare experiment ce durează circa 7 ore)[23].

Pirosecvenţierea masivă paralelă (figura 5.11) implică fragmentarea iniţială a ADN în piese scurte de 300-500 pb, urmată de legarea la capete a unor adaptori oligonucleotidici diferiţi (unul dintre ei având o moleculă de biotină). Fragmentele de ADN cu adaptori legaţi sunt apoi denaturate şi ataşate pe suprafaţa unor

22. Tehnologia a fost dezvoltată în anii 2000 de către compania 454 Life Sciences şi comercializată ulterior de Roche.
23. O metodă înrudită este cea a **tehnologiei Solexa**, comercializată de Illumina care a devenit în prezent metoda cea mai utilizată de secvenţiere masivă paralelă. Acesta permite citirea unor secvenţe mai scurte (circa 100 pb), dar lungimea totală a secvenţei obţinute este mult mai mare (18 Gb pentru un experiment ce durează 4 zile sau 35 Gb pentru un experiment ce durează 9 zile).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

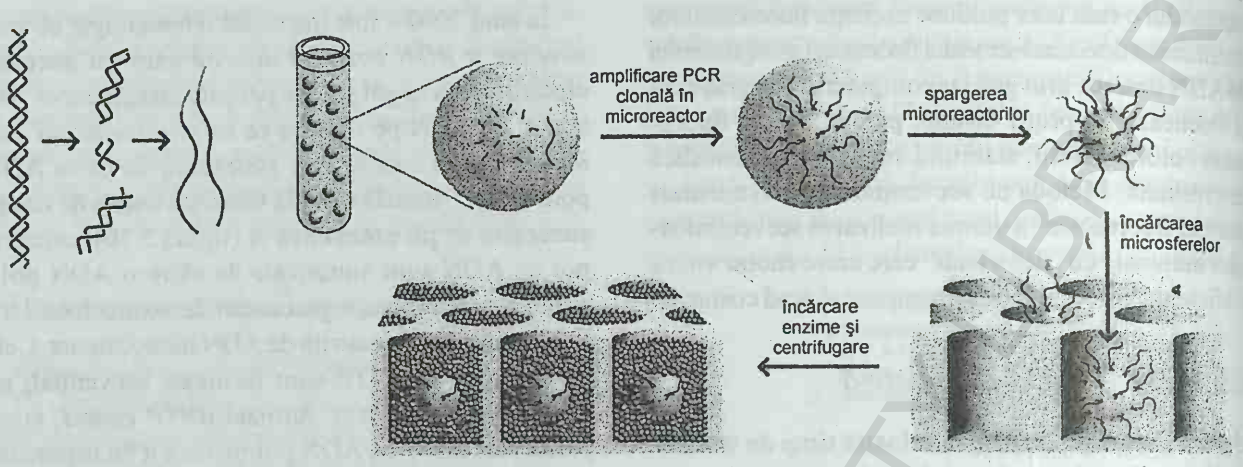


Figura 5.11. Etapele pirosecvenţierii masive paralele
(modificat după Strachan şi Read, 2010)

microsfere acoperite cu streptavidină (ce recunoaşte cu mare afinitate biotina). Microsferele sunt apoi separate individual cu ajutorul unei emulsii apă-ulei astfel încât fiecare picătură apoasă conţine o singură microsferă şi toţi componenţii necesari pentru PCR. După amplificarea prin PCR fiecare microsferă are ataşate pe suprafaţă circa 10 milioane copii ale fragmentului de ADN iniţial, imobilizate prin legături biotină-streptavidină. Emulsia este apoi dispersată, iar microsferele sunt depozitate în interiorul unor microcavităţi (o microsferă în fiecare cavitate) „săpate" pe o lamă de fibră optică (ce conţine 1,6 milioane de cavităţi); aceste cavităţi sunt apoi umplute cu alte microsfere mult mai mici care au ataşate pe suprafaţă ATP sulfurilază şi luciferază. Plăcile care conţin aceste microsfere sunt apoi spălate cu o succesiune precisă de precursori dNTP (T, apoi A, apoi C, apoi G), iar lumina emisă în cadrul fiecărei reacţii este înregistrată corespunzător fiecărei cavităţi.

O tehnologie alternativă este secvenţierea masivă paralelă prin ligare, sau **tehnologia SOLID** (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation Detection*)[24]. Această tehnologie foloseşte de asemenea strategia PCR pentru amplificarea fragmentelor de ADN individuale. Produşii amplificaţi sunt depozitaţi apoi aleatoriu pe suprafaţa unor microreţele ce conţin oligonucleotide marcate fluorescent. Această tehnologie permite citirea unor fragmente scurte (circa 50 pb), cu o secvenţă totală de 30 Gb (experiment de 7 zile) sau 50 Gb (experiment de 14 zile).

b) Secvenţierea masivă paralelă fără amplificarea ADN

Această tehnologie de secvenţiere, cunoscută şi sub numele de **secvenţiere de generaţia a treia**, permite *secvenţierea unor molecule unice de ADN, neamplificate*. Aceasta permite eliminarea erorilor ce pot apărea în cursul amplificării ADN, iar tehnologia este mai simplă şi are proiectate preţuri mai reduse.

Prima tehnologie din această categorie a fost introdusă în 2008 (*HeliScope* de către compania Helicos Biosciences). Această metodă presupune cicluri de adiţie a unor nucleotide urmate de spălare; de aceea lungimea unei secvenţe citite este de doar 30 pb. Deoarece reacţiile sunt extrem de dens compactate spaţial (circa 100 milioane molecule matriţă pe 1 cm pătrat) tehnologia permite citirea a circa 40 Gb pentru un experiment de 8 zile.

Există alte câteva tehnologii în curs de dezvoltare şi care au potenţialul de a schimba profund secvenţierea ADN, atât din punct de vedere al rapidităţii, cât şi a preţului de cost. Cea mai promiţătoare dintre acestea este **tehnologia SMRT** (*single-molecule real-time sequencing*), ce va permite secvenţierea ADN la viteze de circa 20.000 ori mai mari decât tehnologiile de generaţia a doua aflate în prezent pe piaţă.

Tehnologia SMRT se bazează pe două inovaţii cheie. Prima constă în utilizarea unor dNTP marcate cu fluorocromi în poziţia γ a grupării fosfat. *Fiecare dNTP este marcat cu un fluorofor diferit*. În momentul încorporării de către ADN polimerază, semnalul fluorescent este citit în timp real, înainte ca polimeraza să cliveze gruparea trifosfat. Datorită acestei clivări se evită inhibiţia sterică a reacţiei de către un exces de grupări fluorocrome anterior încorporate. În acest fel pot fi citite secvenţe lungi de ADN. În plus, ADN polimeraza folosită (Φ29) este extrem de activă, permiţând o reacţie rapidă de polimerizare a ADN. A doua inovaţie a acestei tehnologii este *folosirea microreţelelor SMRT*, ce constau într-un film foarte subţire de metal depozitat pe un substrat de sticlă. Microreţeaua conţine mii de orificii minuscule, fiecare cu un volum de doar 20 zeptolitri (10^{-21} litri) care constituie în fapt camerele de vizualizare nanofotonică ce privesc deplasarea ADN polimerazei în timp ce aceasta realizează reacţia de sinteză a ADN.

24. Tehnologia SOLID a fost dezvoltată de compania Applied Biosystems.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cu o serie de îmbunătăţiri ulterioare se estimează că tehnologia SMRT va permite secvenţierea întregului genom uman *în circa o oră, la un preţ de cost de numai 100 dolari.*

O altă nouă direcţie importantă în secvenţierea masivă paralelă fără amplificarea ADN este aşa-numita **secvenţiere în nanopori.**

Aceasta foloseşte ca substrat solid siliconul fabricat în aşa fel încât să conţină pori foarte mici (nanopori) prin care sunt induse să treacă nucleotidele în cursul încorporării lor în molecula de ADN ce este sintetizată. În timp ce trec prin nanopor, fiecare nucleotid blochează parţial şi în mod specific (în funcţie de natura lor: A, T, C sau G) nanoporul. Deoarece substratul de silicon este parcurs de curent electric, fiecare tip de nucleotid induce o modificare caracteristică (ce poate fi înregistrată) a curentului electric, producând unde de puls tip A, T, C sau G.

Secvenţierea masivă paralelă a transformat radical genetica moleculară, fiind amplu folosită în secvenţierea rapidă a genomului uman, pentru determinarea genomului personal, identificarea mutaţiilor şi variantelor polimorfice asociate cu bolile comune, analiza transcriptomului şi a interacţiunilor dintre ADN şi proteinele implicate în reglarea expresiei genelor.

C. Analiza expresiei genelor

Analiza structurii genelor normale sau anormale trebuie completată cu *studiul funcţiei sau expresiei acestor gene* la nivel de transcript ARN sau proteină, folosind diferite tehnologii prin care se apreciază natura, sursa şi cantitatea produsului de expresie, a una sau mai multe gene (tabel 5.3). În cazul mutaţiilor genice este important de stabilit defectul molecular al proteinelor codificate şi modul în care ele produc un fenotip anormal.

1. Analiza expresiei genelor la nivel de ARN

Analiza expresiei genelor la nivel de ARN poate fi studiată printr-o varietate de metode bazate pe hibridizare.

- **Northern blot**, metodă descrisă mai sus, permite determinarea mărimii transcriptelor unor gene şi abundenţa lor relativă în diferite ţesuturi şi linii celulare.
- **Testul de protecţie la ribonucleaze** permite evaluarea cantitativă a unor produşi de transcripţie specifici anumitor gene, identificaţi cu o sondă ARN complementară, dintr-un amestec de ARN total.

  Tehnica constă în incubarea unei sonde ARN monocatenare marcate, antisens faţă de gena de interes, cu amestecul de ARN total, în condiţii ce favorizează hibridizarea complementară a genei ţintă cu sonda. După hibridizare, amestecul este tratat cu o ribonuclează care digeră toate moleculele monocatenare de ARN, dar nu şi pe cele de ARN bicatenar rezultate în urma hibridizării. ARN bicatenar este apoi separat prin electroforeză în gel denaturant de poliacrilamidă. Intensitatea semnalului obţinut corespunde cantităţii de transcript specific prezent în proba ţintă.
- **Hibridizarea tisulară *in situ*** analizează în detaliu locul în care se exprimă genele în ţesuturi (pe

Tabel 5.3. Modalităţi de analiză a expresiei genelor

(modificat după Strachan şi Read, 2010)

Material de studiu	Metodă	Numărul de gene sau proteine analizate la un moment dat	Rezoluţie
ARN	*Hibridizare fluorescentă* in situ – tisulară sau celulară	mic (una sau câteva gene)	mare
	Northern blot	mic → mediu	mică
	Protecţia la ribonucleaze		
	RT-PCR sau real-time PCR/Q-PCR		
	Hibridizare pe *microreţele ADN*	mare	mică
Proteină	Western blot	mic	mică
	Imunocitochimie		mare
	Microscopie imunoflourescentă		
	Electroforeză bidimensională în gel de acrilamidă	mare	mică
	Spectrometrie de masă		

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

secțiuni histologice), folosind fie o sondă ADN, fie o ribosondă antisens, marcate radioactiv sau cu fluorocromi; metoda se poate aplica și la studiul expresiei genelor într-un embrion intact sau pe culturi de celule.

Metoda folosește fie o sondă ADN, fie o sondă de ARN („ribosondă"), complementară ARNm studiat. Marcarea sondei se realizează radioactiv (P^{33} sau S^{35}), situație în care vizualizarea rezultatelor se face prin autoradiografie urmată de microscopie în câmp întunecat (dark-field microscopy), ori de microscopie în câmp luminos (bright-field microscopy) sau, mai frecvent, cu ajutorul unor fluorocromi, analiza rezultatelor fiind făcută prin microscopie cu fluorescență.

- **RT-PCR și real-time PCR (Q-PCR).** Metodele prezentate mai sus nu permit analiza produșilor de transcripție cu număr mic de copii. În acest caz se apelează la o amplificare prin PCR, plecând de la ARN care este mai întâi copiat – cu transcriptază inversă (RT) – în ADNc. Această metodă *RT-PCR* nu permite însă o evaluarea cantitativă precisă; în acest scop se folosește *real-time PCR* numită și *Q-PCR* (*quantitative PCR*) în care, cu echipamente PCR speciale, produsele de amplificare sunt evaluate cantitativ continuu, la fiecare ciclu a reacției PCR.

Cuantificarea expresiei genelor prin Q-PCR se bazează pe detecția unor semnale fluorescente, generate după legarea anumitor compuși la produsul amplificat, în stadiile inițiale ale PCR, atunci când reacția de amplificare este liniară. Există două tipuri principale de sisteme de detecție: detecția nespecifică (principala metodă din această categorie este cea a compusului SYBR Green I) și detecția specifică, prin hibridizarea unor probe, precum probele tip balize moleculare (Beacon) și probele TaqMan.

După descifrarea secvenței genomului uman s-a trecut la etapa de *genomică funcțională* în care se evaluează *profilul transcripțional* (transcriptomul) la scară mare. Cele mai folosite tehnici sunt **microrețelele ARN**, iar mai recent **metodele de secvențiere paralelă masivă** (descrise anterior) care încep să revoluționeze analiza transcriptomului.

2. Analiza expresiei genelor la nivel de proteine

Analiza unor proteine este posibilă prin metode care folosesc anticorpi specifici (Western blotting, imunohistochimie) sau prin folosirea unor epitopi atașați proteinei de interes (urmată de microscopie fluorescentă). Evaluarea profilului proteic global se poate face prin electroforeză bidimensională în gel de poliacrilamidă urmată de identificarea proteinelor prin spectrometria de masă. Mai recent au fost introduse și microrețelele proteice.

- **Western blotting.** Pentru evaluarea cantitativă și, uneori calitativă, a unei proteine normale sau mutante, *extrasă din celulele* unor pacienți cu boli genetice, a fost imaginat un procedeu asemănător metodelor Southern și Northern, botezat *Western blotting*.

Proteinele *izolate* dintr-un extract celular sunt *separate*, pe baza mărimii lor, prin electroforeză în gel de poliacrilamidă. Apoi sunt *transferate* pe un filtru de nitroceluloză și incubate cu un *antiser specific* pentru proteina respectivă. Complexul antigen (proteină) – anticorp (antiser) este identificat cu ajutorul unui *anti-anticorp* (anticorp ce recunoaște primul anticorp folosit în reacție) marcat radioactiv sau fluorescent.

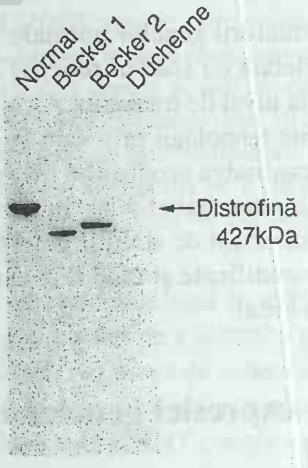


Figura 5.12. O analiză Western blot ce arată prezența sau absența distrofinei, la pacienți cu formă severă de Distrofie Musculară Duchenne și forme medii de DM Becker

(modificat după Nussbaum *et al.*, 2001)

Metoda Western blot permite diferențierea între bolnavii cu forme grave de boală (prin absența totală a proteinei) și forme medii (cantități mici de proteină); de exemplu, forma gravă Duchenne și forma medie Becker a distrofiei musculare legată de X (figura 5.12). De asemeni, se pot evidenția heterozigoții, purtători sănătoși de gena mutantă (Na) care vor avea o cantitate mai redusă (la jumătate) de proteină normală comparativ cu homozigoții sănătoși (NN).

- **Imunohistochimia.** Localizarea tisulară a unei anumite proteine poate fi analizată prin *imunohistochimie*, pe secțiuni de organe fixate în formaldehidă și impregnate în parafină sau în culturi celulare, prin folosirea unor anticorpi specifici marcați cu fluorocromi.
- **Analiza proteinelor prin marcarea cu epitopi.** În unele cazuri nu sunt disponibili anticorpi specifici împotriva proteinei de interes. În aceste circumstanțe

proteina poate fi marcată prin ataşarea la capătul amino- sau carboxi-terminal a unei secvenţe peptidice (*epitop* oligopeptidic) care este recunoscută de un anticorp specific marcat fluorescent. Mai recent se foloseşte fuziunea proteinelor studiate cu proteine mici care sunt autofluorescente în mod natural; de exemplu, proteina GFP (*green fluorescent protein*).

- **Evaluarea profilului global proteic** în diferite celule se face prin electroforeză bidimensională (încărcătură + masă) în gel de poliacrilamidă (**2D-PAGE**), care separă miile de proteine sintetizate în celule, sau prin cromatografie lichidă de înaltă performanţă (**HPLC** – high performance liquid chromatography). Proteinele astfel separate pot fi apoi analizate prin **spectrometrie de masă** (**MS** – *mass spectrometry*).

  Înainte de analiza prin MS proteinele sunt fragmentate prin digestie enzimatică cu proteaze[25]. Masele determinate prin analiza experimentală MS sunt apoi comparate cu cele din baze de date. Există numeroase variante de MS. Cele mai utilizate metode pentru analiza proteinelor sunt bazate pe ionizarea blândă a acestora, care evită ruperea lor în fragmente întâmplătoare: metoda **MALDI** (matrix-assisted laser desorbtion/ionization) şi metoda **ESI** (electrospray ionization).

- **Microreţelele proteice** au fost introduse de curând şi sunt încă în curs de perfectare. În principiu, microreţelele proteice pot fi obţinute în mod asemănător celor cu oligonucleotide ADN, prin ataşarea de proteine sau de anticorpi specifici împotriva proteinelor direct pe lama de sticlă. Pe lângă analiza globală a proteinelor, asemenea microreţele pot fi utilizate şi pentru identificarea substraturilor unor enzime (de exemplu, toate proteinele ce sunt fosforilate de către protein-kinaze). În plus, ele pot fi folosite şi pentru identificarea interacţiunilor proteină-proteină (vezi mai jos).

Deşi studiile de proteomică au demarat doar de câţiva ani, aplicaţiile lor promit să fie deosebite, mai ales în medicină. Astfel, studiind abundenţa diferitelor proteine în probe de la persoane sănătoase şi de la bolnavi sau în probe reprezentând progresia bolii se pot identifica markeri utili şi medicamente-ţintă noi.

3. Analiza partenerilor moleculari ai produşilor codificaţi de gene

Uneori funcţia unor proteine nu este pe deplin înţeleasă nici după cunoaşterea completă a structurii şi profilului său de expresie. În asemenea cazuri, o modalitate de a dobândi informaţii noi privind funcţia proteinei este de a analiza interacţiunile sale cu alte proteine sau cu acizii nucleici. De exemplu, dacă în urma unor asemenea studii se descoperă că o proteină nou identificată interacţionează cu o proteină implicată în matisarea ARN, este foarte probabil că proteina în cauză este de asemenea implicată în acest proces. În felul acesta pot fi descifrate adevărate *reţele funcţionale* ale celulei.

a) Metode de analiză a interacţiunilor proteină-proteină

Există o varietate largă de metode genetice, biochimice şi fizice care pot fi utilizate pentru studierea interacţiunilor proteină-proteină. Unele dintre aceste metode permit analiza globală (*screening*) a interacţiunilor dintre proteina testată şi toţi partenerii săi de interacţiune, în timp ce alte metode sunt desemnate pentru a valida interacţiunea dintre două proteine specifice:

- **Metoda hibrizilor între două drojdii** (*yeast two-hybrid*) permite identificarea nediscriminatorie a tuturor partenerilor de interacţiune a proteinei testate. Metoda se bazează pe observaţia că factorii de transcripţie au două domenii-cheie care îşi menţin funcţia şi atunci când sunt separate: un domeniu de legare la ADN (*BD – binding domain*) şi un domeniu de activare a transcripţiei (*AD – activation domain*). Secvenţele ADNc care codifică aceste domenii pot fi fuzionate cu ADNc a proteinei de interes, rezultând proteine de fuziune (hibrizi) care poartă fie BD, fie AD. Dacă proteina care conţine domeniul BD interacţionează cu o proteină care conţine AD al aceluiaşi factor de transcripţie, poziţionarea învecinată între domeniile BD şi AD conduce la reconstituirea activităţii de factor de transcripţie, chiar dacă, cele două domenii sunt situate pe proteine diferite. În cadrul metodei hibrizilor între două drojdii, proteina de interes este folosită drept „*momeală*" („*bait*") pentru identificarea proteinelor cu care aceasta interacţionează. În acest scop se foloseşte o linie de drojdii haploidă care exprimă o proteină de fuziune alcătuită din BD al unui factor de transcripţie şi proteina testată. Această linie de drojdii haploidă este încrucişată cu celule de drojdii haploide care au fost transfectate cu o librărie de ADNc formată prin fuziunea AD a factorului de transcripţie utilizat în experiment alături de porţiunea codantă a mii de proteine (colecţie „*pradă*" – „*prey library*"). Fiecare celulă de drojdie din colecţie „pradă" conţine doar o proteină de fuziune. Celula care conţine „momeala" poartă de asemenea o genă reporter sau un marker de selecţie care nu poate fi activat decât atunci când este reasamblat factorul de transcripţie utilizat în *screening*. Atunci când cele două componente interacţionează gena reporter este activată, permiţând identificarea sa vizuală, sau este activat factorul de selecţie care permite propagarea doar a celulelor pozitive (figura 5.13).

25. De exemplu, tripsina clivează proteinele la capătul C-terminal al reziduurilor de lizină (K) sau arginină (R), cu excepţia situaţiilor în care următorul aminoacid este prolina.

BCU IAŞI – CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

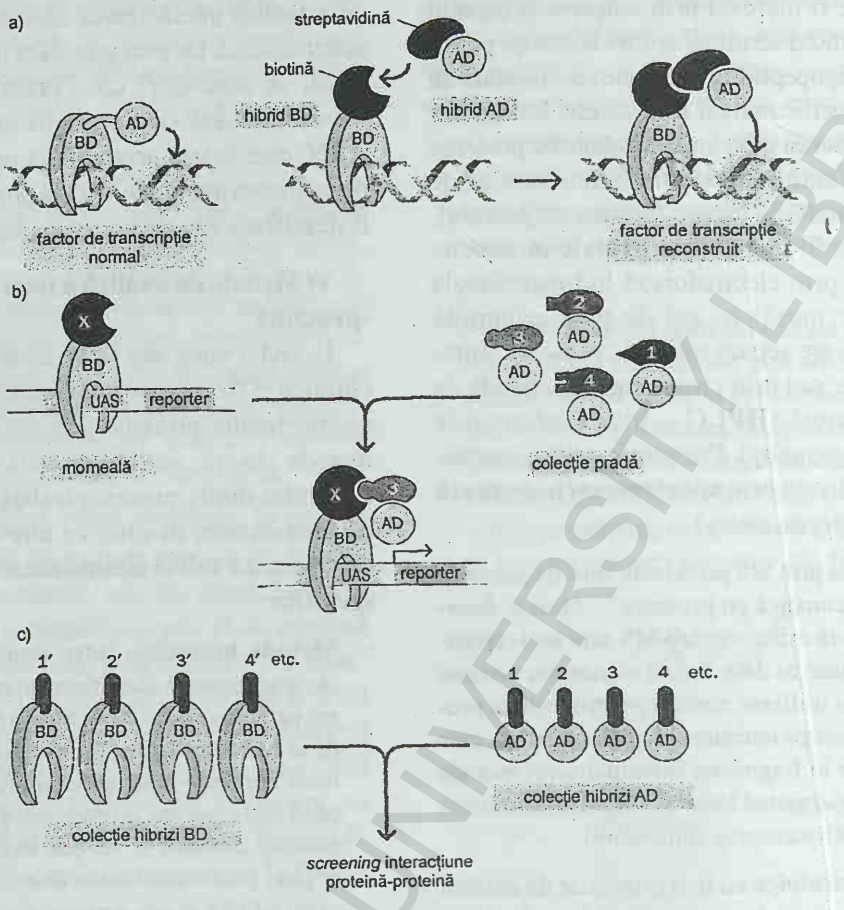


Figura 5.13. Metoda hibrizilor între două drojdii
(modificat după Strachan și Read, 2010)

- **Purificarea prin afinitate cuplată cu spectrometria de masă (AP-MS** – *affinity purification-mass spetrometry*) constă în imobilizarea proteinei testate („momeală") pe un suport insolubil ce poate fi apoi încărcat într-o coloană de cromatografie (cromatografie de afinitate). Apoi se adaugă amestecul de proteine rezultat prin liză celulară. Proteinele care interacționează cu momeala sunt reținute la suprafața suportului, în timp ce restul proteinelor sunt îndepărtate prin spălarea coloanei. Proteinele care interacționează cu momeala sunt apoi recuperate din coloană prin eluție cu soluții de săruri cu concentrații crescânde, sunt purificate prin electroforeză în gel și analizate prin spectrometrie de masă.
- **Transferul energiei de rezonanță a fluorescenței (FRET** – *fluorecence resonance energy transfer*) este o metodă de validare a interacțiunilor dintre proteine identificate prin metodele de *screening* prezentate mai sus. FRET este o metodă de microscopie de fluorescență care monitorizează în timp real interacțiunile foarte strânse între două molecule proteice care sunt marcate cu fluorocromi diferiți (figura 5.14). Unul din cei doi fluorocromi acționează ca donor de energie. Dacă cele două proteine sunt în imediată proximitate (1-10 nm), o parte din energia cu care este excitat fluorocromul donor poate fi transferată fluorocromului acceptor. Ca urmare, o parte semnificativă din energia absorbită de donorul excitat este emisă la o lungime

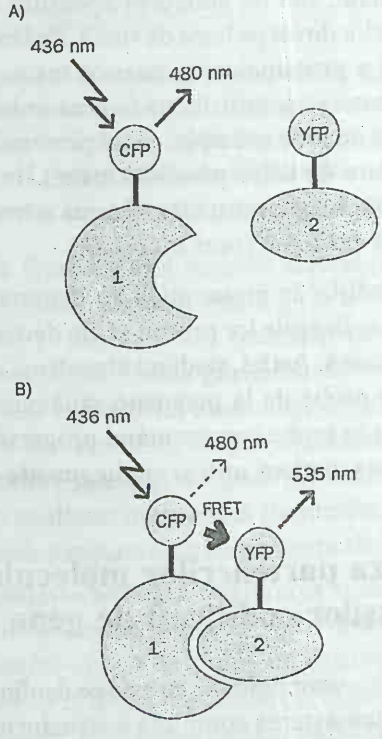


Figura 5.14. Transferul energiei de rezonanță a fluorescenței (FRET)
(modificat după Strachan și Read, 2010)
CFP – proteină fluorescentă cian;
YFP – proteină fluorescentă galben.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de undă mai mare decât dacă donorul şi acceptorul sunt situaţi la distanţă.

- **Co-imunoprecipitarea (co-IP)** este metoda cea mai robustă de validare a interacţiunilor între două proteine. În această metodă se adaugă mai întâi în lizatul celular un anticorp specific faţă de proteina testată, obţinându-se astfel imunoprecipitarea acesteia împreună cu proteinele cu care proteina respectivă interacţionează. Dacă proteina testată interacţionează cu proteina identificată în urma unei metode de *screening*, atunci aceasta din urmă poate fi identificată prin Western blotting, prin utilizarea unui al doilea anticorp specific.

b) Metode de analiză a interacţiunilor proteină-acizi nucleici

Anumite proteine, în special factorii de transcripţie, interacţionează cu secvenţe de ADN specifice. Există mai multe metode de cartografiere a interacţiunilor ADN-proteine. Unele dintre acestea pot fi folosite pentru studii *in vitro* (metoda „urmelor" ADNazei I – *DNaseI footprinting*; metoda schimbării mobilităţii în gel – *gel mobility shift assay*; metoda SELEX – *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*), în timp ce altele pot cartografia aceste interacţiuni *in vivo* (imunoprecipitarea cromatinei – *chromatin immunoprecipitation – ChIP*):

- **Metoda „urmelor" ADNazei I** constă în incubarea iniţială a secvenţei ADN testate (marcată radioactiv) cu proteina de interes, care se leagă la regiunile-ţintă. Apoi se realizează digestia parţială cu ADNaza I pancreatică a două probe din secvenţa ADN testată: una neincubată cu proteina de interes şi alta cu ADN legat. Această digestie conduce la realizarea unor fragmente ADN cu lungimi diferite; în cazul în care secvenţa ADN conţine situsuri de legare ale proteinei studiate, acestea vor fi rezistente la digestia cu DNaza I. În urma separării fragmentelor ADN prin electroforeză în gel se observă alterarea profilului de migrare a ADN legat în raport cu ADN nelegat, cu apariţia unor spaţii libere („*urme*") în gel.
- **Metoda schimbării mobilităţii în gel** este utilizată pentru evidenţierea capacităţii de a lega proteine a unei secvenţe suspectată a avea rol în reglarea transcripţiei. Proteinele legate pot fi ulterior purificate şi identificate. Principiul acestei metode este acela că ADN clonat, marcat radioactiv, cuplat cu proteine, va migra mult mai lent într-un gel de poliacrilamidă faţă de ADN nelegat. Benzile cu migrare lentă pot fi excizate, iar proteinele legate la ADN pot fi purificate prin cromatografie în coloane.
- **Metoda SELEX** este folosită pentru definirea secvenţelor situsurilor de legare a unei proteine studiate. În acest scop este sintetizată mai întâi o colecţie de oligonucleotide care au secvenţe constante la capetele lor 5' şi 3' (folosite ca situsuri de legare a unor amorse) şi secvenţe interne diferite, generate prin sinteza lor întâmplătoare (uneori o astfel de colecţie conţine 10^{13}-10^{15} secvenţe diferite). Toate oligonucleotidele sunt sintetizate astfel încât să aibă lungime identică. Colecţia de oligonucleotide este apoi amestecată cu proteina-ţintă pentru a permite interacţiunea proteină-oligonucleotid, după care amestecul este trecut printr-o coloană de cromatografie care conţine un anticorp specific faţă de proteina studiată. Oligonucleotidele nelegate sunt îndepărtate prin spălare, iar cele legate sunt recuperate şi amplificate cu ajutorul amorselor specifice. Produşii amplificaţi pot fi apoi identificaţi prin secvenţiere.
- **Imunoprecipitarea cromatinei (ChIP)** este cea mai folosită metodă de cartografiere a interacţiunilor ADN-proteine *in vivo*. După fixarea proteinelor la ADN, cu ajutorul formaldehidei, celulele sunt lizate, iar cromatina este extrasă şi fragmentată (prin metode fizice sau enzimatice). Fragmentele ADN care leagă proteina de interes sunt apoi izolate prin utilizarea unui anticorp specific faţă de acea proteină, purificate şi analizate pentru identificarea situsurilor de legare ale proteinei. Această metodă poate fi folosită pentru identificarea situsurilor de legare a proteinelor la scara întregului genom (în acest caz, ADN izolat la finalul experimentului ChIP este analizat prin hibridizarea pe microreţele ADN – metoda ChIP-chip, sau prin secvenţiere – de exemplu, prin folosirea tehnologiei Solexa).

D. Studierea funcţiei genelor prin manipulare genetică

Expresia genelor normale şi mutante, precum şi fenotipul pe care-l determină se află sub controlul unor mecanisme complexe, care implică intervenţia atât a anumitor *secvenţe de ADN*, cu rol de reglare, cât şi a unor *molecule efectoare exogene* care se fixează la ADN. Descifrarea acestor mecanisme este importantă nu numai pentru fiziologia celulei la nivel molecular, ci şi pentru elucidarea patogeniei bolilor moleculare, optimizarea diagnosticului şi, mai ales, a tratamentului lor.

Un pas enorm pentru înţelegerea mecanismelor de reglare a expresiei genelor şi patogeniei bolilor genetice l-a reprezentat introducerea *tehnicilor de modificare dirijată a materialului genetic*, fie *ex vivo*, fie *in vivo*. Aceste metode de **manipulare genetică** (numită şi *genetică inversă*), prin care se modifică secvenţa sau expresia genelor şi, în consecinţă, se produce un fenotip anormal, permit obţinerea unor informaţii extrem de preţioase privind rolul normal al genei atât la nivel de celule, cât şi la nivelul întregului organism.

Studiile de manipulare genetică sunt interzise la om şi sunt posibile numai prin folosirea unor culturi de celule umane sau organisme de laborator model.

- Culturile de celule reprezintă o modalitate foarte potrivită şi rapidă de analiză, care poate furniza

informații utile privind rolul unor gene în anumite tipuri de celule, folosind mai ales tehnologia ARN interferent (vezi mai jos).

- Organisme model cele mai folosite în studii de manipulare genică sunt: *Saccharomyces cerevisiae* (drojdia de bere), *Caenorhabditis elegans* (viermele rotund), *Drosophila melanogaster* (musculița de oțet), *Danio rerio* (peștele zebră) și *Mus musculus* (șoarecele), considerat în prezent cel mai util model animal pentru înțelegerea funcției genelor umane.

1. Principalele metode de manipulare genică

Manipularea genică se poate realiza prin diferite metode.

(1) **Inactivarea directă a unei gene endogene** (la nivel de ADN) sau a expresiei sale (ARN, proteină).

- *Inactivarea genei la nivel de ADN* presupune deleția sa, completă sau parțială, sau introducerea unor mutații care împiedică formarea unui transcript ARN stabil. Inactivarea prin *knockout* a genelor poate fi efectuată la *întâmplare* (experimente de *screening mutațional*) sau *țintit*, într-o genă specifică (*gene targeting*). În unele situații inactivarea unei gene-țintă poate fi realizată prin introducerea unei *gene reporter* (precum lacZ) sau a unei gene care codifică o proteină fluorescentă în interiorul genei-țintă. În aceste circumstanțe gena țintită este inactivată, în timp ce gena reporter este exprimată sub influența secvenței promotor a genei inactivate (*gene knock-in*).
- *Inactivarea expresiei genei la nivel ARN* (*gene knock down*) se realizează prin utilizarea tehnologiei antisens: molecule de ARN sau oligonucleotide sintetice cu o secvență complementară transcriptului (ARNm) genei studiate se hibridizează cu acest transcript sens și blochează expresia genei respective. În mod curent se folosește tehnologia *ARN interferent* (care conduce la degradarea ARN) sau *oligonucleotidele antisens morfolino* [26] (ce împiedică translația).
- *Inactivarea expresiei genei la nivel de proteine* poate fi realizată cu ajutorul unor *proteine mutante* care se leagă la proteina normală și îi blochează funcția (efect dominant-negativ), cu ajutorul unor *aptameri* (acizi nucleici sau peptide sintetice care se leagă la proteina de interes și o inactivează) sau cu ajutorul unor *anticorpi* care sunt capabili să funcționeze în interiorul celulelor (*intrabodies*).

(2) **Folosirea unor *transgene*** care induc expresia unei gene-țintă la un *nivel anormal crescut* (prin cuplarea sa cu un promotor puternic) sau *expresia ectopică* a genei, fie într-un tip diferit de celule decât cele care exprimă gena în mod normal, fie într-un moment diferit al dezvoltării.

2. Manipularea genică *in vivo*

Una dintre modalitățile cele mai valoroase de studiere a funcției unor gene specifice este manipularea genetică *in vivo*, folosind diferite animale model. După obținerea gazdelor, se analizează efectele (expresia) secvenței analizate (creșterea/diminuarea sintezei unor proteine; modificarea proprietăților proteinei produse) într-un context *in vivo*, care integrează efectele tuturor parametrilor naturali. Analiza rezultatelor trebuie făcută însă cu mare *prudență*, deoarece trebuie să se țină cont de o serie de elemente ce nu sunt încă controlabile: localizarea și stabilitatea inserției, posibilitatea de a fi modificată de celule, diferențe de efect la om și animal.

Deși manipularea genetică poate fi realizată la mai multe modele animale, în cele ce urmează vom prezenta pe scurt doar câteva principii folosite în metodele de manipulare genetică la șoarece, larg folosită pentru replicarea unor boli umane. Cu toate progresele obținute în realizarea de modele animale, replicarea unor boli umane rămâne încă destul de dificilă, datorită unor diferențe de diversitate genetică, reglare a expresiei genice, căi metabolice, fiziologie celulară și căi de dezvoltare etc. (caseta 5.2). Depășirea unor asemenea diferențe este posibilă în oarecare măsură prin realizarea așa-numitor *„șoareci umanizați"* – șoareci modificați prin inginerie genetică pentru a fi asemănători omului pentru procesul fiziologic studiat.

a) Producerea de șoareci transgenici

Pentru generarea unui șoarece transgenic o secvență de ADN exogen (*transgenă*) este inserată în genomul liniei germinale a animalului. Gena conținută în secvența ADN exogen va putea fi transmisă urmașilor și exprimată în celulele acestora. Transgenele inserate permit hiperexpresia unor gene normale sau expresia unor gene mutante.

Pentru a ajunge în celulele liniei germinale, ADN exogen trebuie mai întâi inserat în genom. Modalitatea cea mai frecvent folosită de administrare a transgenelor este *microinjecția în pronucleul masculin* (mai mare decât cel feminin) al unui zigot proaspăt fertilizat (figura 5.15). În urma acestei modalități de administrare

26. Oligonucleotidele antisens morfolino sunt polimeri sintetici de nucleotide modificate (bazele azotate sunt atașate la un inel *morfolino* în loc de riboză) fiind rezistente la atacul nucleazelor și deci foarte stabile.

CASETA 5.2

Generarea de modele animale ale bolilor umane

Numeroase animale au fost manipulate genetic pentru a modela clasele majore de boli umane precum bolile monogenice, bolile autoimune, cancerele sporadice sau bolile infecţioase. Modelarea bolilor umane la şoarece este în prezent modalitatea majoră; totuşi au fost folosite şi alte specii de vertebrate şi nevertebrate pentru elucidarea bazelor moleculare ale bolilor umane.

Modelarea bolilor monogenice produse prin mutaţii cu pierderea funcţiei

Multe boli monogenice, precum majoritatea celor cu transmitere recesivă şi multe dintre cele cu transmitere dominantă sunt produse prin mutaţii cu pierderea funcţiei. Principala modalitate de modelare a unor asemenea boli este introducerea prin recombinare omoloagă a unor mutaţii în celulele ES de şoarece. Modelarea bolilor produse de ***alele nule*** *se realizează adesea prin introducerea unui codon stop prematur. În cazul bolilor caracterizate prin heterogenitatea mutaţiilor se poate recurge uneori la generarea unor* ***alele umanizate****. În unele cazuri mutaţiile pot induce fenomene de matisare alternativă care exclud exonul ce conţine mutaţia, conducând la fenotipuri mai puţin severe. Modelarea unor asemenea boli este posibilă prin generarea unor* ***alele hipomorfe****.*

Modelarea bolilor monogenice produse prin mutaţii cu câştig de funcţie

Modelarea bolilor dominante produse prin mutaţii cu câştig de funcţie, precum şi a unor cancere sporadice produse prin activarea unor oncogene este posibilă prin expresia unor ***transgene mutante****. În cazul bolilor produse prin expansiunea unor repetiţii trinucleotidice, modelarea este posibilă prin generarea unor* ***şoareci knock-in*** *care conţin repetiţia trinucleotidică inserată în contextul locusului endogen.*

Modelarea bolilor produse anomalii cromozomice

Până în prezent au fost generate puţine modele animale pentru boli produse prin anomalii cromozomice. În cazul bolilor produse prin microdeleţii poate fi utilizată tehnologia ***recombinării Cre-loxP*** *pentru generarea unor deleţii omoloage celor umane (fezabilă atunci când conţinutul genic al segmentului cromozomic afectat este conservat între cele două specii). Bolile produse prin microduplicaţii pot fi modelate prin inserarea în genomul şoarecilor a unor* ***transgene YAC*** *ce conţin genele implicate în microdeleţia umană. Cu toate acestea, modelarea bolilor umane este adesea limitată de lipsa conservării sinteniei între specii. O modalitate radicală de modelare a bolilor produse prin trizomii cromozomice este generarea unor* ***şoareci transcromozomiali*** *care poartă o copie aproape completă a cromozomului uman implicat în producerea bolii studiate. Un asemenea model a fost realizat recent pentru sindromul Down; deşi modelul prezintă o serie dintre caracteristicile bolii umane, o parte dintre celule pierd cromozomul uman, rezultând nivele diferite de mozaicism cromozomic în diverse ţesuturi.*

Modelarea cancerelor umane

Unele linii de şoarece pot dezvolta cancere în mod spontan sau în urma expunerii la radiaţii, substanţe chimice sau virusuri oncogene. Utilizarea unor asemenea modele are însă utilitate limitată pentru înţelegerea patogeniei cancerelor umane. Generarea unor şoareci cu inactivarea unor gene supresoare de tumori a avut un succes limitat în modelarea cancerelor umane. Adesea şoarecii dezvoltă tumori cu localizări diferite de cele umane (de exemplu inactivarea Nf2 la şoarece conduce la apariţia de osteosarcoame sau adenocarcinoame pulmonare în loc de schwannoame şi meningioame) sau nu dezvoltă deloc tumori (de exemplu, inactivarea genelor Brca1 sau Brca2). Inactivarea condiţională (prin tehnologia Cre-loxP) a permis deleţia în ţesuturi specifice a ambelor alele ale unor gene supresoare de tumori. Această tehnologie a permis o mai bună modelare a bolilor umane. De exemplu, inactivarea ambelor alele ale genei Nf2 în celulele Schwann a condus la dezvoltarea de schwannoame, permiţând astfel generarea unui model util pentru studiul neurofibromatozei tip 2. Modelarea cancerelor produse prin activarea unor oncogene este posibilă prin inserţia unor transgene la nivelul locusului Rosa26 care permite expresia continuă a genei inserate. O altă modalitate este folosirea unor sisteme inductibile, precum cele bazate pe folosirea tamoxifenului sau doxiciclinei.

Modalităţi noi de modelare a bolilor umane

Dezvoltarea continuă a tehnologiilor de manipulare genetică şi secvenţierea completă a genomurilor mai multor specii a permis obţinerea unor modele ale unor boli umane la alte specii decât la şoarece. Exemple sunt modelarea bolilor neurodegenerative la D. melanogaster, a bolii Huntington la Rhesus macaque, a fibrozei chistice la porc etc. Mai mult, tehnologia RNAi a fost utilizată pentru modelarea unor boli umane la peştele-zebră, iar nucleazele cu degete de zinc au permis inactivarea unor gene specifice la peştele-zebră şi la şobolani. Mai recent, tehnologia inducerii celulelor stem pluripotente a permis modelarea in vitro *a unor boli umane prin folosirea unor fibroblaşti recoltaţi de la pacient; aceştia sunt mai întâi transformaţi în celule ES, iar apoi celulele ES sunt diferenţiate în ţesutul afectat al pacientului (de exemplu neuroni).*

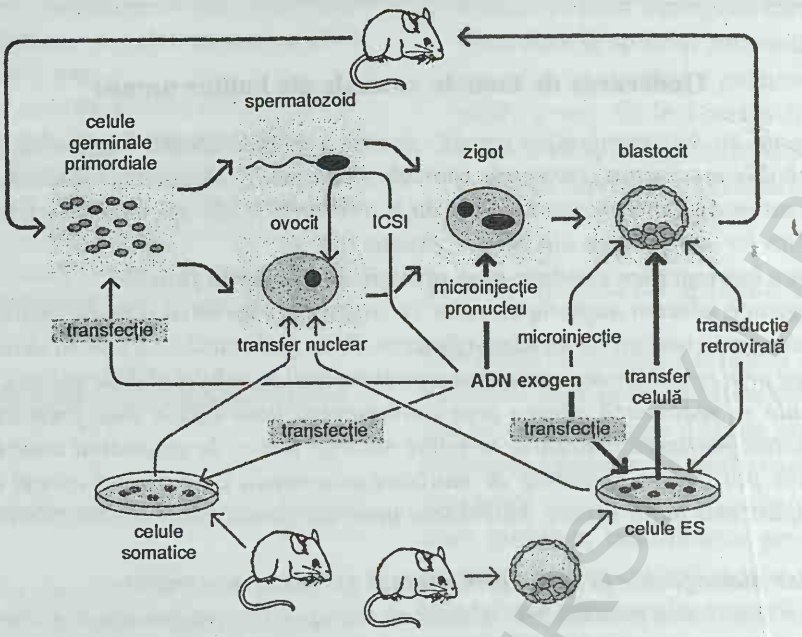


Figura 5.15. Modalități de a produce șoareci transgenici
(modificat după Strachan și Read, 2010)

transgena se integrează de regulă la întâmplare într-un singur situs cromozomial. Integrarea transgenei în genom după microinjecția pronucleului masculin nu se produce imediat, ci după una sau două diviziuni celulare. Ca urmare, animalul rezultat este un mozaic ce conține atât celule transformate, cât și celule netransformate. Dacă celulele transformate contribuie la formarea liniei germinale (circa 40% din cazuri), atunci transgena este transmisă generației următoare, conducând la formarea de animale transgenice complete.

Pentru a obține expresia dorită a transgenei (într-un anumit țesut sau într-un moment specific al dezvoltării embrionare) este necesară adesea folosirea unor elemente reglatoare specifice, cum sunt *promotorii inductibili exogeni*. Aceștia pot fi activați sau inactivați, în funcție de necesitate, prin administrarea unor liganzi chimici specifici.

Expresia transgenelor poate fi influențată în mod radical de elementele reglatorii locale din regiunea cromozomială de integrare. De aceea, ele sunt subiectul unor *efecte de poziție*: dacă integrarea se realizează în regiuni în care există elemente activatoare, atunci expresia lor este crescută, în timp ce integrarea într-o regiune heterocromatică poate conduce la atenuarea transgenei. Pentru evitarea efectelor de poziție se pot utiliza transgene formate din secvețe ADN lungi, care conțin toate elementele reglatorii native ale unei gene, inclusiv cele aflate la distanță. Asemenea transgene mari sunt realizate prin folosirea unor sisteme de clonare precum YAC (ce conțin megabaze de ADN).

b) Modificarea țintită a unor gene endogene (gene targeting)

Această metodă permite obținerea unor informații foarte valoroase despre funcția specifică a unei gene[27]. Cea mai frecventă modalitate de modificare țintită a unei gene se bazează pe fenomenul de *recombinare omoloagă realizat în culturi de celulele stem embrionare* (ES), provenite de la un alt embrion. În această metodă, un vector ADN ce conține secvența mutantă a genei de interes (alături de o serie de casete de selecție) este introdus prin electroporare în ES. Celulele ES modificate genetic sunt apoi injectate în stadiul de blastocist al unor embrioni, conducând la nașterea de șoareci transgenici himerici. Dacă celulele ES modificate contribuie la formarea celulelor germinale, prin încrucișarea șoarecilor himerici cu șoareci normali, în generația a doua se vor naște șoareci mutanți heterogeni în proporție de 50% (figura 5.16).

Un progres semnificativ este utilizarea sistemelor care permit *inactivarea condițională* a unor gene. Aceasta permite inactivarea genei de interes doar în anumite tipuri de celule și în etape bine definite ale dezvoltării, în timp ce restul organismului păstrează funcția normală a genei respective.

Inactivarea condițională a genelor se bazează pe folosirea unor sisteme de recombinare izolate din organisme inferioare. Cele mai folosite sisteme sunt Cre-*loxP* izolat de la bacteriofagul P1 și FLP-FRT izolat din plasmidul

27. În prezent sunt derulate câteva proiecte internaționale care și-au propus inactivarea individuală a tuturor genelor din genomul șoarecelui. Asemenea programe sunt EUCOMM (European Conditional Mouse Mutagenesis) și KOMP (Knock-out Mouse Project).

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

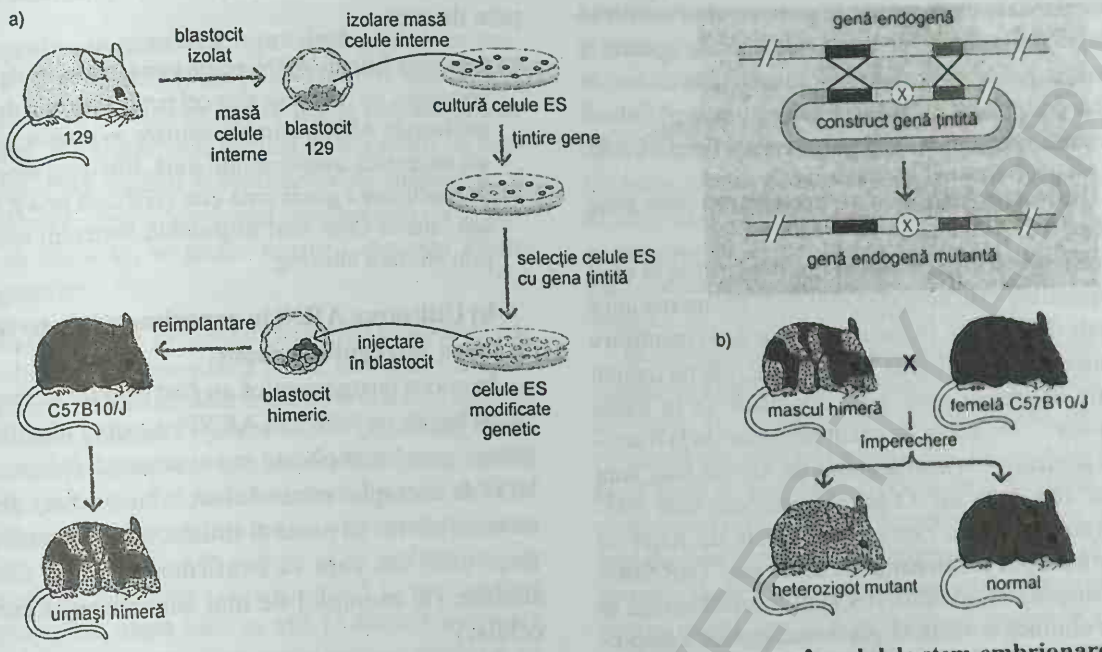


Figura 5.16. Inducerea de mutaţii prin modificarea ţintită a unor gene în celulele stem embrionare
(modificat după Strachan şi Read, 2010)

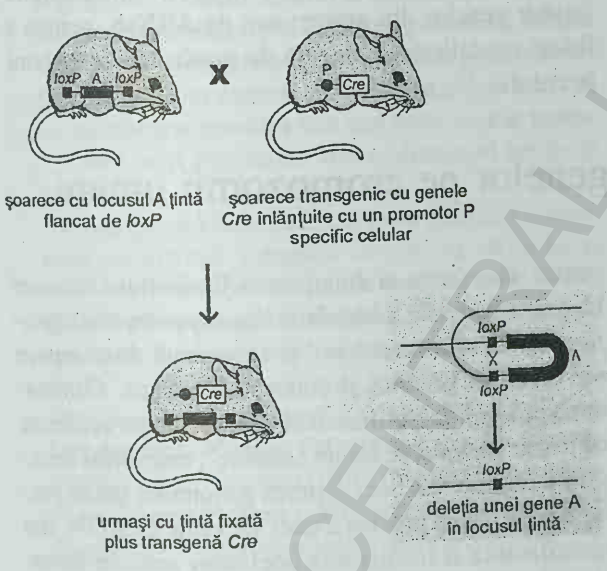


Figura 5.17. Inactivarea condiţională a unei gene prin recombinarea specifică a locusului Cre-IoxP
(modificat după Strachan şi Read, 2010)

de 2 μm al *S. cerevisiae*[28]. Pentru a se obţine inactivarea unei gene într-un tip celular dorit sunt generaţi şoareci transgenici care au recombinaza sub controlul promotorului unei gene cu specificitate tisulară (de exemplu, folosirea promotorului pentru insulină asigură activitatea recombinazei exclusiv în celulele beta ale pancreasului). Prin încrucişarea unui şoarece care are gena de interes flancată de exemplu cu secvenţe loxP şi a unui şoarece care poartă o transgenă Cre se vor obţine descendenţi cu o deleţie condiţională (figura 5.17).

c) Metode de *screening* bazate pe mutageneza întâmplătoare a genelor

Pe lângă generarea de mutaţii ale unor gene specifice, există şi metode de *mutageneză întâmplătoare* la scara întregului genom. Acestea sunt folosite în special ca metode de genetică inversă în care se urmăreşte identificarea tuturor genelor care conduc la producerea unui fenotip definit. Există câteva metode de mutageneză folosite mai frecvent: mutageneza chimică (foloseşte în special etilnitrozoureea, datorită eficacităţii sale crescute) şi mutageneza inserţională cu ajutorul unor transgene defective (*gene trapping*) sau cu ajutorul unor transposoni (precum transposonul *Sleeping Beauty* – Frumoasa Adormită şi transposonul *piggyBac* – PB).

3. Tehnologii bazate pe interferenţa ARN

Această tehnologie este cea mai folosită metodă de analiză a funcţiei genelor în experimentele efectuate pe culturi de celule. Metoda se bazează pe existenţa

28. Recombinaza Cre recunoaşte secvenţele loxP, iar recombinaza FRT (flipaza) recunoaşte secvenţele FRT (ambele de 34 pb.) cu o mare specificitate. Atunci când două asemenea secvenţe sunt localizate pe aceeaşi moleculă de ADN şi au aceeaşi orientare, rezultatul recombinării induse este deleţia secvenţei intercalante şi menţinerea unei singure secvenţe *loxP* sau FRT. Dacă secvenţele *loxP* au orientare diferită în urma recombinării se produce o inversie.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ARNi, o cale celulară normală, care a evoluat probabil ca o modalitate de protecție împotriva unor secvențe potențial periculoase de acizi nucleici, în special a virusurilor. În cadrul acestei căi formarea unor molecule de ARN bicatenar (ARNds – *double stranded*) induce inactivarea specifică a unor gene (vezi și figura 4.2.8).

a) Utilizarea ARNi pentru inactivarea unor gene specifice

Pentru a inactiva produsul de transcripție al unei gene specifice este necesară mai întâi obținerea unor molecule de ARNds. În cazul celulelor de la mamifere administrarea de molecule lungi de ARNds nu induce inhibiția expresiei unor gene specifice ca în cazul *C. elegans*[29]. De aceea, în cazul celulelor de la mamifere, ca alternative la administrarea de ARNds lung, sunt utilizate alte două căi. O primă asemenea cale folosește transgene care exprimă molecule de ARN cu structură parțial bicatenară, „în ac de păr" (ARNsh – *short hairpin*). O altă cale frecvent folosită constă în sinteza chimică a două oligoribonucleotide complementare scurte care sunt apoi aliniate pentru a forma echivalentul sintetic al unei molecule de ARNsi (ARN interferent scurt). Aceste oligonucleotide au 20-25 baze, iar sevențele sunt alese în așa fel încât să formeze capete protruzive 3' cu două baze de deoxitimidină (acestea au eficiență mult mai crescută în inducerea fenomenului de interferență decât moleculele cu capete drepte).

Întrucât eficiența ARNi poate varia în funcție de natura secvenței, de regulă se aleg cel puțin 3 perechi de oligonucleotide ARNsi complementare cu diferite porțiuni ale moleculei transcriptului țintă. Eficiența procesului de inactivare a genei țintă este verificată prin RT-PCR sau, atunci când sunt disponibili anticorpi specifici, prin western blotting.

b) Utilizarea ARNi în experimente de *screening* la scara întregului genom

În epoca postgenomică au fost inițiate numeroase studii bazate pe folosirea ARNi cu scopul identificării tuturor genelor implicate într-o anumită funcție celulară (de exemplu, controlul ciclului celular). Pentru ca acest sistem să poată fi utilizat este necesară existența unui test care să confirme afectarea funcției studiate (în exemplul de mai sus, blocarea ciclului celular).

Pentru efectuarea screening-ului ARNi sunt create mai întâi colecții (biblioteci) corespunzătoare de ARNsi (sintetizate pe cale chimică) complementare tuturor genelor din genom sau de ARNsh, pentru a folosi modalitatea naturală de producere a ARNmi în celule.

E. Cartografierea și identificarea genelor pe cromozomii umani

Localizarea unei gene pe un anumit cromozom a fost inițial un „exercițiu intelectual", fără consecințe practice, determinat de curiozitatea și dorința de cunoaștere a spiritului uman. Progresele remarcabile ale cartografierii genomului uman din ultimii 30 ani au generat însă *multiple aplicații în teoria și practica medicală*, pentru înțelegerea mecanismelor bolilor genetice, optimizarea diagnosticului bolilor genetice (mai ales prenatal sau presimptomatic), creșterea eficienței sfatului genetic (ce stabilește riscul de apariție sau reapariție a bolii) și eventual pentru tratamentul bolilor genetice, prin terapie genică (prin inserția unei gene normale la indivizii afectați de o boală genetică).

În aceste condiții, realizarea unei *hărți complete a genomului uman*, un fel de *„enciclopedie a tuturor genelor noastre și bolilor genetice asociate lor"* a devenit obiectivul central al geneticii medicale. Cartografierea genelor a fost o etapă prealabilă necesară pentru abordarea și finalizarea Proiectului Genom Uman. *Multe din tehnicile utilizate pentru cartografiere au devenit „istorie"* și reprezintă doar repere ale evoluției geniului și cunoașterii umane. Cunoașterea principiilor, utilizării și descoperirilor realizate cu aceste metode, devenite „clasice", este totuși necesară și instructivă. Secvențierea genomului uman permite localizarea precisă a unei secvențe de ADN, dar identificarea și localizarea unei/unor gene ce determină boli monogenice sau susceptibilitatea la boli comune necesită mai întâi o altă abordare, cartografierea genetică.

1. Cartografierea genomului uman

Cartografierea genelor pe cromozomii umani s-a realizat folosind două metode: cartografierea genetică și cartografierea fizică.

29. Transferul de ARNds lung induce la mamifere un răspuns de apărare antivirală ce are ca rezultat atenuarea nespecifică a expresiei genelor. Acest răspuns este rezultatul activării proteinkinazei PKR (ce e indusă și de interferon). Odată activată, PKR fosforilează factorul 2 de inițiere al translației (eIF2α), conducând la inactivarea sa și la inhibiția generală a procesului de translație. PKR fosforilează de asemenea 2',5' oligoadenilat sintetaza (2',5'AS), care, fiind astfel activată, induce o ribonuclează ce determină degradarea nespecifică a tuturor speciilor de ARNm.

BCU "IULIU HAȚIEGANU" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.1. Cartografierea genetică

Cartografierea genetică reprezintă evaluarea tendinţei a două segmente de ADN (o genă morbidă şi un marker) de a segrega împreună în meioză şi a se transmite *înlănţuite* de la părinţi, prin gameţi, la descendenţi. Prin studiul *fenomenelor de înlănţuire şi recombinare genică* omoloagă (produs prin *crossing-over* în meioză), se poate *măsura distanţa* dintre locii genetici.

Localizarea unei gene morbide începe cu studiul unor familii în care se manifestă boala. La membrii acestor familii se va analiza distribuţia bolii şi a unor markeri genotipici polimorfi[30] pentru fiecare cromozom, urmărind stabilirea unei înlănţuiri genice între gena morbidă şi un anumit marker. Dacă cele două segmente de ADN sunt situate în loci foarte apropiaţi pe acelaşi cromozom, ele nu segregă în meioză şi au tendinţa de a se transmite împreună (co-segregare) în succesiunea generaţiilor. Dacă locii se află la distanţă mai mare unul de altul, între ei se poate produce aleatoriu un *crossing-over* (CO), prin care se realizează un schimb reciproc de material genetic, iar segmentele nealele segregă, se transmit separat şi formează combinaţii noi (recombinanţi). Probabilitatea producerii acestui fenomen de *recombinare genică omoloagă* este direct proporţională cu distanţa fizică dintre genele nealele: cu cât **distanţa genetică** este mai mare, cu atât probabilitatea unui eveniment recombinaţional creşte şi invers.

Distanţa genetică între doi loci se poate determina *comparând genotipurile urmaşilor cu cele ale părinţilor* şi evaluând **frecvenţa (fracţia) de recombinare**; ea este definită prin proporţia descendenţilor recombinanţi în raport cu numărul total de descendenţi sau **scorul LOD**[31] şi este notată cu litera grecească teta (Θ). Unitatea de măsură a distanţei genetice dintre doi loci a fost denumită Morgan (M), în onoarea lui Thomas Morgan, care a descoperit (1910) fenomenul de *crossing-over*. Un **centiMorgan** (*cM*)[32] *este o distanţă genetică în care se produc recombinări cu o frecvenţă de 1%.*

Analizele de înlănţuire genetică (*linkage analysis*), bazate pe studiul familiilor, reprezintă o metodă valoroasă de cartografiere, deoarece permite stabilirea poziţiei unor gene (loci) pe acelaşi cromozom (fenomen numit *sintenie*), a ordinii şi distanţei dintre ele. În prezent, tehnicile bazate pe microreţele permit testarea rapidă a sute de mii de SNPs răspândite în genom pentru a urmări co-segregarea cu un anumit fenotip (de exemplu, o boală). Dacă există o co-segregare semnificativă se poate determina distanţa dintre marker şi gena ce produce fenotipul. *Distanţa genetică* dintre loci, măsurată în cM, este o evaluare funcţională (o descriere a comportării meiotice a genelor) care nu corespunde exact *distanţei fizice* reale (măsurată în Kb) ce-i separă deoarece *frecvenţa de recombinare nu este constantă de-a lungul unui cromozom, între cromozomi diferiţi şi la cele două sexe*. Precizia prin care o anumită genă este localizată prin această metodă depinde de numărul de meioze studiate.

O altă metodă de cartografiere genetică este reprezentată de **analizele de asociere** bazate pe studii populaţionale; în aceste studii se cercetează frecvenţa (crescută sau scăzută) a unui „set" de alele (markeri) la un grup de persoane afectate de o anumită boală, comparativ cu un grup de persoane sănătoase. **Analizele de asociere la scara întregului genom (GWA –** *genome wide association*) sunt astăzi larg utilizate pentru identificarea unor variante genetice cauzale în bolile complexe, multifactoriale (vezi capitolele 8 şi 14).

1.2. Cartografierea fizică

Cartografierea fizică constă în *localizarea fizică reală a genelor* într-o anumită regiune a unui cromozom, folosind anumiţi markeri. Cu ajutorul unor metode de analiză cromozomială şi moleculară, *poziţia* unor gene este descrisă în unităţi determinate prin măsurători fizice ale distanţelor dintre markeri. Se realizează astfel o **hartă fizică** care este *reprezentarea poziţiei reale (ordine, distanţe măsurate în perechi de baze) a genelor într-un cromozom sau regiune cromozomală.* Obiectivul final al cartografierii fizice este stabilirea integrală a secvenţelor nucleotidice liniare din fiecare cromozom.

Cartografierea fizică se realizează în principiu în două mari etape: *localizarea fizică* globală a unei gene sau secvenţe de ADN pe un anumit cromozom şi apoi *localizarea regională*, din ce în ce mai precisă pe acel cromozom.

Metodele folosite iniţial au fost:

- hibrizi celulari somatici interspecifici (om/rozătoare);
- dozarea produsului genei pe clone celulare cu monozomii sau trizomii ale unui anumit cromozom sau regiuni cromozomiale;

30. Pentru a fi utili în cartografiere, markerii genetici trebuie să fie foarte polimorfici (de exemplu, minisateliţi, microsateliţi, SNPs). Gradul înalt de polimorfism creşte probabilitatea ca familiile să fie informative (cu părinţi heterozigoţi pentru un marker) şi face posibilă stabilirea fără dificultăţi a fazei de înlănţuire, precum şi identificarea persoanelor recombinante din familie. Din cauza mărimii genomului uman trebuie testaţi sute de markeri, bine aleşi, pentru a găsi o înlănţuire.
31. LOD este un acronim de la *„logarithm of odds"*, deci logaritm al raportului de probabilitate. Calculul „scorului LOD" este complex şi se realizează pe calculatoare cu ajutorul unor programe informatizate speciale (de exemplu, LINK-MAP).
32. 1 cM este echivalentul unei secvenţe ADN de 1 Mb.

- analiza unor anomalii cromozomiale structurale (translocații, microdeleții, microduplicații) prezente întâmplător la bolnavi cu afecțiuni.

Toate aceste metode, bazate pe analiza cromozomilor, permit localizarea unor gene sau secvențe de ADN pe un cromozom, regiune sau, cel mult, o bandă cromozomală (1-5x10^6 pb). Pentru *localizarea fină* a genelor s-au folosit ulterior tehnicile de ADN recombinant, clonarea celulară și analiza moleculară de înaltă rezoluție. Ele acoperă „veritabila prăpastie" ce există între dimensiunile unei benzi cromozomale (1.000-5.000 Kb) și cele ale taliei maxime a unui segment de ADN clonat (de circa 50 Kb) în care se includ genele de talie mijlocie.

Evident, pentru un segment de ADN cromozomial de 1.000 Kb există în băncile genomice mai multe secvențe clonate de 20-50 Kb. Problema esențială este de *a ordona aceste secvențe*, de a le reuni fizic pentru a obține un segment continuu de mai multe sute de Kb. Pentru aceste „acțiuni" s-au pus la punct noi tehnici de **cartografiere de înaltă rezoluție** care au menirea să „acopere" intervalul metodologic între analiza citogenetică și analiza moleculară și să realizeze o cartografiere moleculară pe distanțe mari.

1.3. Aplicațiile cartografierii genomului uman

Aplicarea strategiilor de cartografiere a genomului uman a reprezentat un progres remarcabil pentru cunoașterea organizării și funcționării aparatului genetic și un veritabil succes în practica medicală. *Harta genică reprezintă de fapt anatomia genomului uman.* Așa cum anatomia este necesară pentru înțelegerea funcției corpului uman, cunoașterea hărții genice este indispensabilă pentru înțelegerea funcției genomului uman și, prin extensie, a noii fiziologii moleculare umane. Localizarea unor gene mutante cu efect patologic sau „gene morbide" – în anumite regiuni cromozomiale a demarat realizarea *„anatomiei patologice* a genomului uman". Pe această bază au fost dezvoltate cu succes mai multe acțiuni:

- clonarea genelor pe baza localizării lor pe cromozomi (*„clonare poziționlă"*);
- elucidarea unor mecanisme patogenice în anumite boli monogenice sau multifactoriale;
- dezvoltarea unor noi metodologii de diagnostic genotipic cu ajutorul markerilor ADN;
- dezvoltarea strategiilor de terapie genică.

2. Identificarea genelor ce produc boli umane

Pentru izolarea și clonarea unei gene, ce produce o boală ereditară, există două posibilități (figura 5.18).

- Prima posibilitate pleacă de la identificarea prealabilă a defectului funcțional și/sau a produsului genei – proteina anormală, pe baza căruia se identifică și se localizează gena morbidă. Această metodă „a geneticii clasice", folosită înainte de 1980, este numită **clonare funcțională** (deoarece pleacă *de la funcție la genă*); ea a permis identificarea mai multor gene, ce produc diferite boli: hemoglobinopatii, hemofilia etc.
- A doua modalitate se bazează pe progresele tehnologiilor ADN recombinant, realizate după 1980, care permit localizarea genei morbide într-o anumită regiune din cromozomi, în care se identifică apoi o genă candidat, ce produce prin mutație fenotipul patologic. Această metodă care pornește *de la genă și ajunge la funcție* și la proteină se numește *„genetică inversă"* sau **„clonare poziționlă"**. Ea a fost aplicată cu succes la identificarea celor mai frecvente boli ereditare monogenice (de exemplu, distrofia musculară Duchenne, fibroza chistică, boala Huntington, boala polichistică renală transmisă autozomal dominant sau cancerul colo-rectal familial) și are avantajul că oferă posibilitatea unui *diagnostic genotipic precoce*, chiar și atunci când nu au fost complet rezolvate toate etapele de identificare.

După stabilirea secvenței complete a genomului uman (2001 și 2004) identificarea genelor morbide

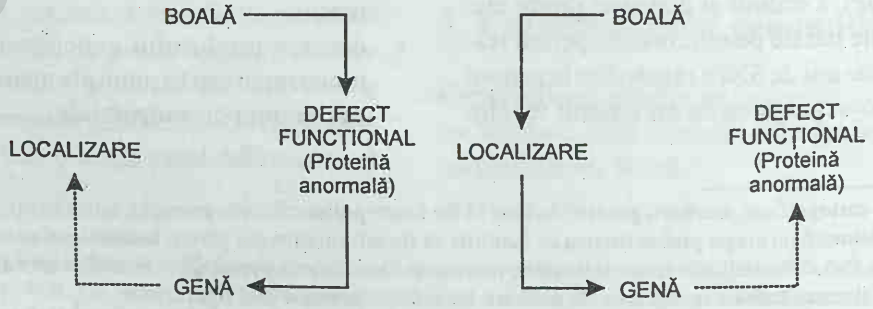


Figura 5.18. Compararea etapelor de realizare ale clonării funcționale și clonării poziționale
(modificat după Gelherter *et al.*, 1998)

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

s-a făcut, mai ales prin clonarea poziţională, într-un ritm accelerat, dependent de accesul la familii informative de bolnavi, care prin analize de înlănţuire genetică permit determinarea *localizării genei într-o regiune candidat.* Se foloseşte însă şi clonarea funcţională atunci când nu sunt disponibile informaţii poziţionale sau nu sunt necesare, existând abordări alternative mai simple. Ambele metode ajung la identificarea unei **gene candidat** care este sau nu confirmată ca fiind gena morbidă prin identificarea unor mutaţii la pacienţi neînrudiţi. Din păcate procesul de validare nu este întotdeauna simplu deoarece boala poate fi produsă de modificări în *ARN necodant* situat la distanţă de secvenţele codante, normale, sau poate implica o serie de *modificări epigenetice* ce alterează structura cromatinei: la acestea se adaugă şi heterogenitatea genetică de locus.

Despre identificarea variantelor ADN ce produc susceptibilitatea la boli complexe, multifactoriale vom discuta în capitolul 14.

2.1. *Identificarea genelor morbide prin clonare poziţională*

În clonarea poziţională, identificarea unei gene morbide se face pe baza localizării sale cromozomiale aproximative, într-o **regiune candidat** prin studii de înlănţuire genică (combinate eventual cu studii pe animale model) sau prin analiza unor anomalii structurale prezente întâmplător la bolnavii cu afecţiuni monogenice.

- Cartografierea genetică se realizează pe familii informative, mari, cu o anumită boală ereditară. În prima etapă, folosind studiile de *înlănţuire genică*, se defineşte cât mai precis posibil o anumită *regiune candidat*. Apoi, se stabileşte lista genelor care se găsesc în această regiune, folosind bazele de date[33] disponibile (de exemplu, Ensembl sau Santa Cruz), şi în final se selectează dintre acestea una sau mai multe *gene candidat*, care au o funcţie adecvată sau un model de expresie concordant cu fenotipul patologic. O alternativă utilă este studiul omologiei cu o genă cunoscută la om (gene paraloage) sau la animale model (gene ortoloage), cel mai frecvent şoarece, a căror mutaţii produc un fenotip asemănător.
- În locul analizei de înlănţuire se poate folosi o metodă alternativă de localizare genică studiind pacienţi cu boli monogenice care *au întâmplător* o anomalie de structură a cromozomilor, o translocaţie reciprocă echilibrată sau o inversie. În aceste cazuri *punctele de ruptură* pot produce alterarea unei secvenţe critice a genei codante sau rearanjările echilibrate la microscop se dovedesc în fapt neechilibrate (microdeleţii sau microduplicaţii) la nivel molecular. Un exemplu este identificarea genei *NSD1* în sindromul Sotos, la un pacient cu translocaţie t(5;8)(q35;q24.1). În prezent se utilizează frecvent căutarea sistematică a unei microdeleţii folosind microreţele *CGH*.

2.2. *Identificarea genelor morbide fără informaţii poziţionale (clonare funcţională)*

Identificarea genelor se poate face uneori fără a dispune în prealabil de informaţii poziţionale despre regiunea candidat, prin metodele descrise mai sus, fie pentru că aceste informaţii nu se pot obţine, fie că nu sunt necesare, dispunând de alte căi alternative.

- *Identificarea unei gene morbide prin cunoaşterea produsului ei proteic.* Pornind de la secvenţa de aminoacizi a proteinei, se pot stabili (pe baza codului genetic) toate variantele de secvenţă ADN posibile pentru acea secvenţă de aminoacizi (luând în considerare posibilitatea ca un aminoacid să fie codificat de mai mulţi codoni). Cu ajutorul unor sonde complementare se face *screening*-ul unei bănci de ADNc sau, mai simplu în prezent cu ajutorul computerelor, se caută secvenţa/gena relevantă în bazele de date genomice.
- *Identificarea unei gene morbide prin funcţia sau interacţiunile produsului ei.* Dacă defectul funcţional sau biochimic ce produce o boală poate fi observat în culturi celulare se va căuta proteina sau fragmentul de ADN care va corecta acest defect (studii de complementare funcţională). Dacă o boală afectează *o cale biochimică* atunci fiecare componentă a căii este un candidat pentru boală.
- *Identificarea unei gene morbide prin studiul unei gene omoloage* la animale model ce dezvoltă aceeaşi boală.

2.3. *Confirmarea genei candidat*

Toate metodele descrise mai sus converg spre identificarea unei *gene candidat*. Ultima etapă de analiză este stabilirea certă că această genă candidat este şi gena morbidă. Pentru această confirmare, în bolile monogenice se efectuează *screening*-ul unor mutaţii în genă la pacienţi *neînrudiţi* care prezintă boala,

33. Înainte de finalizarea PGU această operaţiune se realiza prin clonarea unui număr mare de segmente de ADN din *regiunea* candidat, cu ajutorul vectorilor YACs (500-1.000 Kb) şi BACs (50-200 Kb).

comparativ cu un lot control (pentru a determina dacă modificarea găsită este sau nu patogenică). O alternativă este inducerea unei mutații prin tehnologia ARN interferent în gena candidat normală.

Acțiunea de confirmare, prin mutații, a genei candidat se confruntă însă cu două dificultăți majore.

- *Heterogenitatea de locus* ce există frecvent atunci când mai multe gene sunt implicate într-o cale funcțională/un releu de dezvoltare sau când acestea codifică o proteină funcțională multimerică, mutația oricăreia dintre aceste gene producând un fenotip identic.
- *Modificările epigenetice* pot produce o boală fără modificarea secvenței ADN (mai ales în celulele tumorale).

Aplicarea metodelor descrise în această secțiune pentru identificarea genelor boală sau a altor secvențe ce produc anumite caractere fenotipice normale se încadrează în studiile actuale de **genomică funcțională** (vezi capitolul 3).

Bibliografie specifică selectivă

1. Bilitewski U. *DNA microarrays: an introduction to the technology*. Methods Mol Biol 2009; 509:1-14.
2. Collas P. *The state-of-the-art of chromatin immunoprecipitation*. Methods Mol Biol 2009; 567:1-25.
3. Collins FS. *Sequencing the human genome*. Hosp Practice 1997; 32:35-54.
4. Dufva M. *Introduction to microarray technology*. Methods Mol Biol 2009; 529:1-22.
5. Elles R, Mountford R. *Molecular diagnosis of genetic disorders*. ed. a II-a. Totowa NJ, Humana Press, 2003.
6. Hoheisel JD. *Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis*. Nat Rev Genet 2007; 7:200-210.
7. Hurst GD, Werren JH. *The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution*. Nat Rev Genet 2001; 2:597-606.
8. Joos T, Bachmann J. *Protein microarrays: potentials and limitations*. Front Biosci 2009; 14:4376-4385.
9. Majevski J, Ott J. *Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome*. Genome Res 2002; 12:1827-1836.
10. Metzker ML. *Sequencing technologies - the next generation*. Nat Rev Genet 2010; 11:31-46.
11. Ng PC, Kirkness EF. *Whole genome sequencing*. Methods Mol Biol 2010; 628:215-226.
12. Nygaard V, Hovig E. Methods for quantitation of gene expression. Front Biosci 2009; 14:552-569.
13. Park PJ. *ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology*. Nat Rev Genet 2009; 10:669-680.
14. Rister J, Desplan C. *Deciphering the genome's regulatory code: the many languages of DNA*. Bioessays 2010; 32:381-384.
15. The International Human Sequencing Consortium. *The human genome: Sequencing and initial analysis*. Nature 2001; 409:860-921.
16. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. Biotechniques 2008; 4:619-626.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 6

TRANSMITEREA INFORMAȚIEI EREDITARE

Informația ereditară, necesară pentru sinteza diferitelor proteine și realizarea caracterelor fenotipice, *se transmite* din generație în generație, în două etape (vezi figura 1.1, capitol 1):

- biosinteza unor noi molecule de ADN identice cu molecula inițială și dublarea cantității de ADN, prin *replicare semiconservativă*;
- distribuția totală (integrală), egală și precisă a materialului genetic dublat, prin *diviziune celulară*.

Aceste procese, riguros controlate, se realizează de obicei cu mare *fidelitate* (exactitate), asigurând astfel *stabilitatea* proceselor ereditare. Evident, ele pot suferi și *erori* (de replicare sau de distribuție) care, în absența unor mijloace eficace de *reparare și eliminare a erorilor*, pot avea consecințe importante la descendenți, producând boli.

Transmiterea informației și caracterelor ereditare, în succesiunea generațiilor de celule și organisme eucariote, este supusă unor *legi obiective și universale*.

A. Replicarea ADN

Descriind modelul structurii ADN, alcătuit din două catene polinucleotidice, antiparalele, legate între ele (prin punți de hidrogen) în mod complementar (A-T; G-C), Watson și Crick au intuit de la început că modelul propus de ei *explică mecanismul de copiere și transmitere a informației genetice* în celulele vii. Schematic, dubla spirală a ADN se separă treptat în cele două catene componente (asemenea deschiderii unui fermoar), formând o structură în formă de Y numită „furcă de replicare". Fiecare catenă servește apoi ca *matriță* sau tipar pentru aranjarea complementară și secvențială (în direcția 5'→3') a dezoxiribonucleotidelor activate, care vor fi polimerizate sub acțiunea ADN-polimerazei (figura 6.1). Astfel, *o moleculă bicatenară de ADN va forma două molecule noi, identice atât între ele, cât și cu molecula „parentală"*, fiecare fiind alcătuită dintr-o catenă „veche" și o catenă „nou-sintetizată"; de aceea, procesul de sinteză al ADN a fost numit **replicare semiconservativă**. În felul acesta, informația genetică este copiată identic și va fi transmisă (perpetuată), prin diviziune celulară, în succesiunea generațiilor de celule. *Replicarea ADN este un proces fundamental al vieții, care stă la baza eredității.*

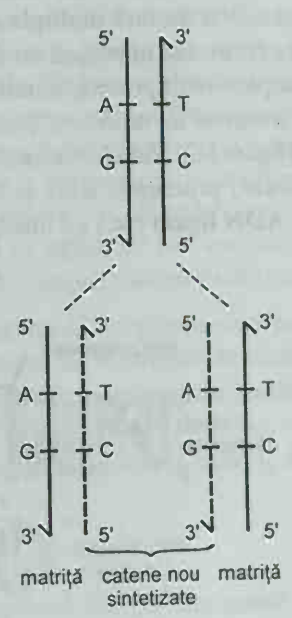


Figura 6.1. Schema replicării ADN pe baza modelului Watson-Crick al structurii bicatenare, complementare și antiparalele a ADN

Experimental, s-a dovedit[1] că procesul real al replicării ADN este concordant cu ipoteza Watson și Crick,

1. Demonstrarea experimentală a replicării semiconservative a fost realizată, cu eleganță și precizie, prin încorporarea unor nucleotide marcate radioactiv sau a bromodezoxiuridinei în moleculele de ADN care se sintetizează.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

dar prezintă un nivel de complexitate care a evoluat de la organismele inferioare la cele superioare. Cele mai multe studii ale mecanismului de replicare a ADN au fost efectuate la procariote şi la eucariotele inferioare (levuri), din cauza facilităţilor experimentale, dar *mecanismul de bază este similar şi la eucariotele superioare*. Replicarea ADN în celulele animale[2] este însă un *proces foarte complex*, datorită mărimii enorme a genomului, fragmentării sale în cromozomi, asocierii cu proteine histonice în nucleozomi şi compactării, prin spiralizare, în fibre de cromatină. În plus, replicarea are loc în faza S a ciclului celular şi este controlată în acest context. Cu toate acestea, *fidelitatea replicării este aproape perfectă* (prin acţiunea unor mecanisme de corecţie a erorilor), menţinând integritatea informaţiei genetice, condiţie esenţială pentru ereditate.

1. Mecanismul molecular al replicării ADN la eucariote

1.1. Aparatul de replicare

Replicarea ADN este realizată de către *ADN polimeraze*, o familie de proteine care catalizează polimerizarea dezoxiribonucleotidelor într-o catenă de ADN. În acest proces intervin însă multiple alte molecule accesorii care formează împreună cu ADN polimerazele un complex multiproteic, numit şi **replizom**, o veritabilă *„maşină de replicare"*, ce se mişcă în lungul ADN (figura 6.2). Piesele componente (topoizomeraze, helicaze, proteinele RPA şi RPC, PCNA, ARN-aza H, ADN ligaza etc.) au funcţii precise, pe care le vom preciza în descrierea procesului de replicare.

La eucariote au fost descrise cel puţin 15 ADN **polimeraze** (Pol) care intervin în replicarea, repararea şi recombinarea ADN; dintre acestea cele mai importante sunt: Pol γ, numită şi ARN primază; Pol β, implicată în repararea ADN; Pol γ, replică ADN mitocondrial; Pol δ şi Pol ε – principalele polimeraze ce realizează elongaţia ADN (câte una pentru fiecare catenă) şi corectarea erorilor de împerechere. ADN-polimerazele folosesc catena matriţă pentru a „stabili" care dezoxiribonucleotid va fi adăugat în catena nouă şi catalizează formarea legăturilor fosfodiesterice între dezoxiribonucleotidele adiacente ce vor forma această catenă. În legătură cu activitatea ADN-polimerazelor este important de subliniat trei caracteristici generale:

- ADN-polimerazele *„nu ştiu" să înceapă sinteza* unei catene, ci numai *să extindă, să alungească*, o catenă de acid nucleic existentă (indiferent dacă este ADN sau ARN); de aceea, sinteza unei catene noi de ADN începe de fapt cu sinteza unei *amorse de ARN* (!) (în engleză *primer*);
- ADN-polimerazele δ şi ε se deplasează pe catena matriţă *3'→5'*, *acţionând în direcţia 5'→3'* şi adăugând un nou nucleotid la extremitatea 3'OH a ultimului nucleotid încorporat (în catena în curs de sinteză); deci ADN polimerazele sintetizează o catenă nouă antiparalelă, *5'→3'*;
- ADN polimerazele *acţionează foarte precis* deoarece recunosc[3] un nucleotid greşit împerecheat (A-A sau T-T) şi-l îndepărtează (datorită activităţii de exonucleaze 3'→5'); ele fac o eroare la 10^6 nucleotide încorporate.

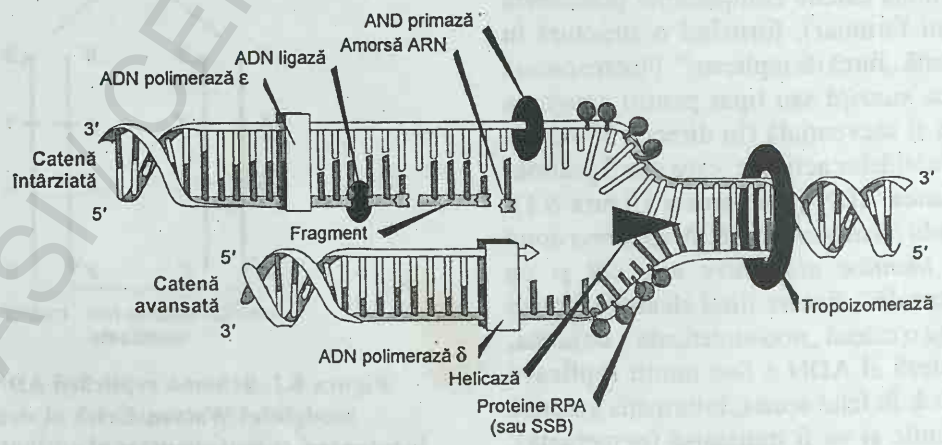


Figura 6.2. Proteinele implicate în replicarea ADN
(modificat după Wikipedia)

2. Replicarea ADN se poate realiza şi *in vitro*, stând la baza metodei PCR de clonare acelulară (vezi capitolul 5.A.2).
3. Prin deformarea diametrului de 2 nm al dublu-helixului ADN.

BCU IAŞI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

1.2. Inițierea replicării

Deși sinteza noilor catene și molecule de ADN se produce în faza S a ciclului celular, pregătirea procesului de replicare are loc în faza G_1 prin formarea *complexului de pre-inițiere a replicării* (pre-RC) în „puncte" definite ale genomului numite **origini de replicare** („**ori**") (figura 6.3.a). În felul acesta, originile sunt „*autorizate*" pentru replicare (li se acordă „*licența de replicare*").

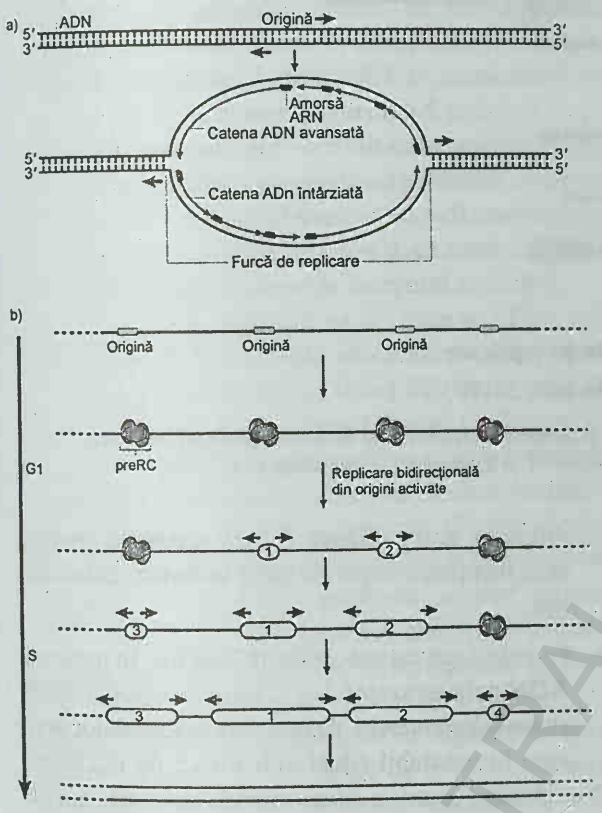


Figura 6.3. Asamblarea complexului de pre-replicare la punctele de origine a replicării ADN

(după Mechali, 2010)

a. Replicarea ADN începe în punctul de origine a replicării și progresează bidirecțional formând furcile de replicare.
b. Activarea asincronă a originilor de replicare în faza S: precoce (1 și 2), medie (3) sau tardivă (4)

Originile de replicare („*ori*") sunt regiuni specifice ale genomului[4] în care se va începe replicarea, prin „deschiderea" ADN bicatenar, pentru a permite aparatului de sinteză a ADN să copieze separat fiecare catenă. În faza G1, originile de replicare sunt recunoscute de *complexul ORC* („*origin recognition complex*"), care se fixează la origini (figura 6.4); după fixarea ORC sunt recrutați doi factori – CDC6 și CDT1 – care au rolul de „a încărca", de o parte și de alta a originii, moleculele MCM2-7 („*minichromosome maintenance protein*"), un heterohexamer cu activitate de *helicază*. Toate aceste molecule „de inițiere" formează împreună **complexul pre-RC**.

Fiecare cromozom uman are puncte de origine *multiple* (figura 6.3.b). (întregul genom posedă circa 100.000 „*ori*"), ce corespund unor mici unități de replicare, de circa 100 kb, numite **repliconi**.

La tranziția G_1/S complexul pre-RC este *activat*, prin acțiunea unor factori multipli (inclusiv de complexul ciclină E–CDK2[5]) care permit fixarea ADN polimerazelor (și altor enzime ale replizomului) și demarajul replicării în faza S (figura 6.4). Activarea complexului pre-RC se face în diferite momente ale fazei S (precoce, mediu, tardiv), în funcție de structura locală a cromatinei și de modificările epigenetice (figura 6.3.b). Acest *asincronism al replicării* ar putea duce la re-replicarea unor regiuni dacă nu ar interveni mecanisme speciale de restricționare a folosirii originilor de replicare numai o dată per ciclu celular.

> Prin separarea „inițierii" replicării de „activare" se asigură *folosirea originilor numai o dată la fiecare ciclu celular*, evitându-se re-replicarea unor segmente de ADN. Reglatorul major al formării complexului de pre-replicare este proteina CDT1; la intrarea în faza S el este eliberat din originile de replicare (de către proteina Geminin) și degradat; în felul acesta „autorizarea de replicare" este anulată și replicarea este permisă o singură dată per ciclul celular.

La sfârșitul fazei G_1 se găsește *punctul de control* G_1 (numit și *punct de restricție*) în care se verifică dacă „totul este gata" pentru replicare și celula ia decizia cheie: trece în faza S (replică ADN și apoi se divide) sau procesul este amânat și trece în faza G_0 de așteptare.

1.3. Procesul de replicare

Procesul de replicare începe în originile de replicare *activate* (care au fixat ADN polimerazele și proteinele

4. Punctele de origine a replicării sunt reprezentate de secvențe specifice de ADN (de circa 3.000 nucleotide) care semnalează startul replicării și permit asamblarea „aparatului de replicare". Aceste secvențe nucleotidice specifice conțin două categorii de elemente: *elemente de tip A*, puternic conservate foarte probabil la toate eucariotele, reprezentate de **secvențele de replicare autonomă** sau **ARS** (de la *autonomously replicating sequence*), bogate în repetiții A=T (se desfac mai ușor, fiind unite numai prin două legături de hidrogen), fără sau cu rari nucleozomi (în care histonele sunt acetilate) și *elemente de tip B*, mai puțin conservate.
5. Ciclina E-CDK2 fosforilează proteinele ce formează complexul de pre-replicare, asamblat la „*ori*", și-l activează, prevenind formarea unor noi complexe.

BUCUREȘTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

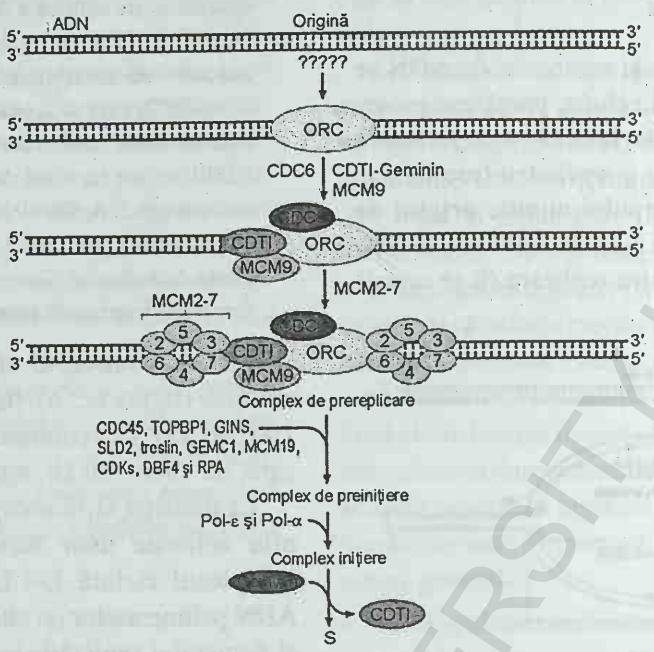


Figura 6.4. Originile de replicare
(modificat după Mechali, 2010)

a. Replicarea ADN începe în punctul de *origine* a replicării şi progresează bidirecțional formând furcile de replicare.
b. Activarea asincronă a originilor de replicare în faza S: precoce (1 şi 2), medie (3) sau tardivă (4)

asociate) şi, de aici, progresează *în ambele direcții*, până ce ADN este complet duplicat (figura 6.3).

- Cromatina este *decondensată* (datorită unei histon-acetil-transferaze din complexul pre-RC), dubla elice este *despiralată* sub acțiunea topoizomerazelor, iar catenele sunt *separate* temporar de către ADN-helicaze (reprezentată de moleculele MCM2-7 ale complexului pre-RC), formând o structură în formă de Y numită *furca de replicare.*
- Pentru a menține catenele desfăcute, pe fiecare catenă matriță „eliberată" se fixează *proteinele RPA* (*sau SSB*), care împiedică re-împerecherea bazelor complementare şi refacerea spontană a dublului helix (figura 6.5.a); catenele matriță sunt menținute separate până la sinteza catenelor noi.
- Pe cele două catene „matriță" are loc, în prezența ADN polimerazelor δ şi ε, *aranjarea secvențială şi complementară* a dezoxiribonucleotidelor *activate* în prealabil (deci sub formă de nucleozid trifosfați, pentru a aduce energia necesară reacției de polimerizare).
- Aşa cum am precizat anterior, *ADN-polimerazele* δ şi ε nu pot iniția sinteza *de novo* a unui lanț polinucleotidic prin *legarea* a două mononucleotide; ele „ştiu" numai să *alungească* catena în curs de sinteză, adăugând un nou nucleotid la

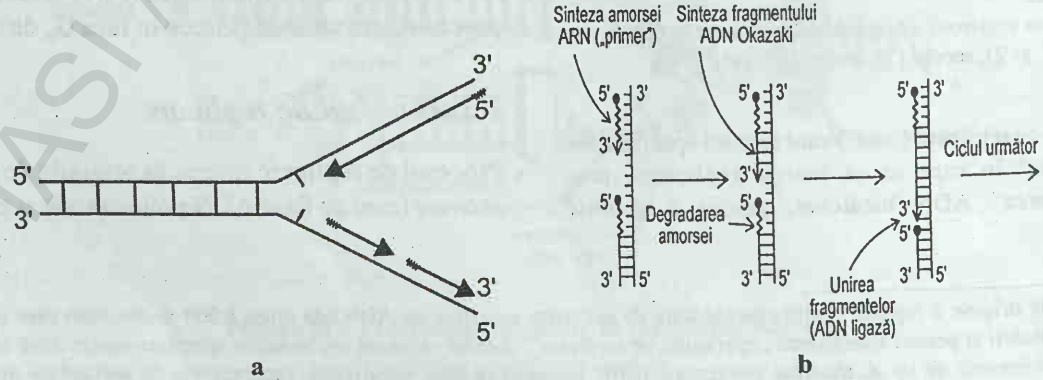


Figura 6.5. Mecanismul molecular al replicării

a) Furca de replicare şi sinteza noilor catene de ADN;
b) Sinteza pieselor Okazaki

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

capătul 3'OH al unui lanț polinucleotidic preexistent; de aceea, declanșarea replicării ADN necesită sinteza unor **amorse** scurte de tip ARN („*primer*") sub acțiunea *primazei* (Pol α)[6] (figurile 6.3 și 6.5.b). Primaza este apoi îndepărtată și ADN polimerazele „preiau ștafeta", continuând sinteza prin adăugarea unui nou nucleotid la capătul 3'OH al lanțului poli-ribonucleotidic preexistent.

- Polimerizarea nucleotidelor se face diferit pe cele două catene matriță deoarece ele sunt *antiparalele*, au orientări diferite, iar ADN polimerazele *acționează numai în direcția 5'→3'*; aceste două caracteristici determină o „*asimetrie*" în procesul de replicare (figurile 6.5 și 6.6.a):
  - pe catena matriță 3'→ 5' sinteza catenei noi, sub acțiunea Pol ε, este *continuă și rapidă* („*leading strand*" sau catenă avansată/rapidă sau directă), pe măsura desfacerii celor două catene; amorsa este necesară *numai* la începutul replicării;
  - pe catena matriță 5'→ 3' sinteza ADN, sub acțiunea Pol α, este *discontinuă*, sub forma unor secvențe scurte (100-1.000 nucleotide) de ADN numite și „**piese Okazaki**", fiind mult mai *lentă* („*lagging strand*" sau catenă întârziată/lentă sau indirectă). Sinteza fiecărui fragment Okazaki necesită o amorsă (figura 6.5.b); ulterior, amorsa este distrusă prin hidroliză (de către ARN-aza H1), golul este „umplut" cu secvențe de tip ADN (sub acțiunea ADN-polimerazei δ) și fragmentul sintetizat este legat la catena de ADN, de către o *ADN-ligază*.
- Un rol important în procesul de replicare îl are o proteină specială în formă de *pensă culisantă*, numită PCNA („*proliferating cell nuclear antigen*")[7]; aceasta încercuiește (ca un inel)[8] catena ADN și glisează în lungul ei, menținând ADN polimerazele în contact strâns cu catena matriță și asistând acțiunea lor.
- Terminarea replicării se face când ADN polimerazele ajung la capătul repliconului (și întâlnesc ADN dublu catenar) sau la capătul catenei matriță (unde se găsește semnalul „ter", de terminare a replicării): pensa culisantă se deschide și este îndepărtată împreună cu polimerazele.

asigură stabilitatea cromozomilor și împiedică unirea cromozomilor prin capetele lor (vezi subcapitolul 2.C.3.1). Telomerele sunt alcătuite din *ADN și proteine*; ADN telomeric este format, la toți cromozomii, prin repetiția în tandem a unui hexanucleotid 5'-TTAGGG-3' pe o catenă („catena bogată în G") și a secvenței complementare 3'- AATCCC-5' pe cealaltă catenă („catena bogată în C") (vezi și figura 2.17).

Datorită particularităților de replicare a capetelor ADN liniar din cromozomi (ce implică folosirea unor *amorse degradabile* pentru inițierea replicării), la fiecare *capăt 5' al catenelor nou-sintetizate* de ADN rămâne o mică regiune (corespunzătoare ultimei amorse) care nu este replicată (figura 6.6.b). Extremitatea moleculelor de ADN rămâne cu o prelungire monocatenară 3', protuberantă și instabilă.

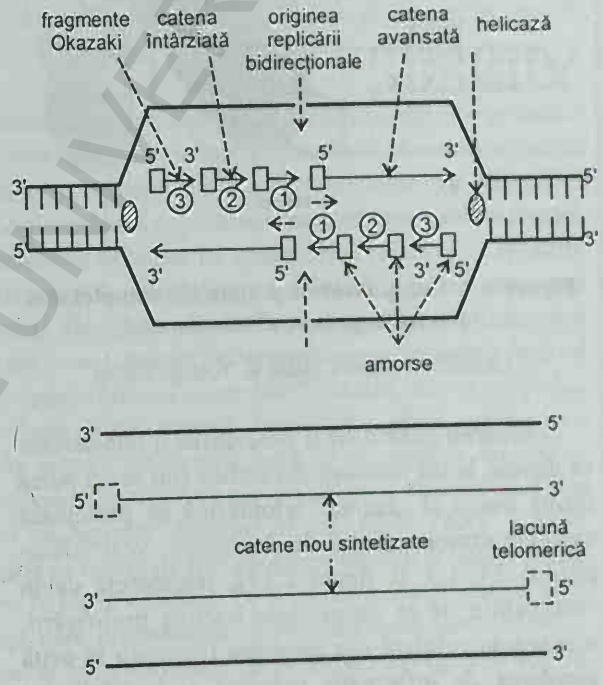


Figura 6.6. Replicarea ADN într-un replicon

(modificat după Etienne, 2001)

a. De la punctul de origine (ori) replicarea se face bidirecțional și diferit pe cele două catene matriță: continuu pe catena *avansată* și discontinuu (în piese mici Okazaki, ce vor fi unite apoi împreună) pe catena *întârziată*.
b. După eliminarea amorselor la extremitatea 5' a catenelor nou sintetizate se produce o lacună, o scurtare a catenei.

2. Replicarea telomerelor

Telomerele sunt structuri cromatiniene *specializate*, situate la capetele cromozomilor eucariotelor, care

Asigurarea replicării complete a capetelor cromozomului se realizează cu ajutorul **telomerazei**, un complex ribonucleoproteic ce conține o subunitate

6. Primaza „citește" catena ADN matriță, adaugă ribonucleotidele complementare și le polimerizează formând un fragment scurt de ARN (circa 20 nt), numit amorsă.
7. PCNA are rol nu numai în replicarea ADN, ci și în reparare sau recombinare.
8. „Încărcarea" proteinei „pensă" pe ADN este realizată de către *proteina de replicare C (RFC)* care îndepărtează în prealabil proteinele RPA.

proteică – **TERT** (ce funcționează ca o *transcriptază inversă*), o subunitate ARN, numită **TERC**, ce este complementară repetiției telomerice și alte proteine[9] (figura 6.7). Telomeraza catalizează adăugarea hexanucleotidelor TTAGGG la capătul 3' a catenei ADN telomerice folosind ca matriță o secvență complementară ARN din subunitatea sa TERC. Enzima este activă în celulele germinale, celulele stem și unele leucocite, dar *absentă în celulele somatice*. În absența telomerazei, ca urmare a replicării incomplete, celulele pierd gradual o parte din secvențele telomerice.

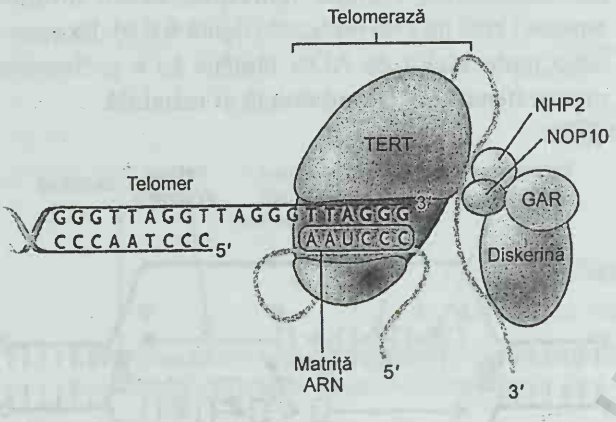


Figura 6.7. Componentele și acțiunea complexului ribonucleoproteic al telomerazei

(modificat după Calado și Young, 2009)

Scurtarea constantă și progresivă a telomerelor va deveni la un moment dat critică (nu se va putea forma bucla și „calota" telomerică ce protejează capetele cromozomului de degradare; vezi subcapitolul 2.C.1.3 și figura 2.17), telomerele devin vulnerabile, și se va produce oprirea proliferării, senescența celulară sau apoptoza (pentru a se evita pierderea de informație genetică și instabilitatea cromozomială). Telomerele ar fi *„călcâiul lui Achile al dublei spirale a ADN"* (Olovnicov, 1993).

Datorită eroziunii permanente a telomerelor, celulele umane pot efectua doar un număr limitat de diviziuni, atât *in vivo*[10], cât și *in vitro*. Acest fenomen explică durata limitată de viață a celulelor somatice în cultură („limita lui Hayflick" = 50-70 diviziuni). Se poate spune că lungimea telomerelor este un *indicator al istoriei replicative* a celulelor și poate fi considerată un fel de *„ceas molecular"* care arată potențialul replicativ *restant* al celulelor normale; când telomerele ating o *lungime minimă critică*, celula încetează să se dividă și *„ceasul"* se oprește. Pierderea telomerelor generează *instabilitatea genomică* și creșterea frecvenței *rearanjărilor cromozomiale*.

Telomeraza poate fi însă *reactivată*, în stresul oxidativ sau în procesele inflamatorii, dar mai ales în celulele canceroase; prin reactivarea telomerazei se oprește scurtarea telomerelor, crește stabilitatea lor (prin adăugarea secvențelor repetitive hexanucleotidice la capetele cromozomilor) și permite *proliferarea celulară nelimitată*, celulele devenind astfel *„nemuritoare"* (*„fenomenul de imortalizare"*).

În ultimii ani, se acordă un interes deosebit studiului corelației dintre scurtarea telomerelor, senescența celulară, expresia telomerazei și cancerele umane. A apărut ceea ce se cheamă *„ipoteza telomer-telomerază a îmbătrânirii și cancerului"* (caseta 6.1), dar și a unui grup nou de boli numite *„sindroame cu scurtarea telomerelor"*.

3. Replicarea ADN și structura cromatinei

În nucleii celulelor, moleculele de ADN formează împreună cu histonele *structuri compacte* sub forma nucleozomilor și fibrelor de cromatină (vezi capitolul 2.C). Se pune firesc o primă întrebarea: cum se comportă aceste structuri în cursul procesului de replicare? Problema este însă mai complicată deoarece diferențierea celulară presupune o serie de *modificări în structura cromatinei* care să permită expresia anumitor gene specific tisulare (prin configurația „deschisă" a cromatinei) și represia altor gene (printr-o configurație „închisă"). Ele se realizează prin *mecanisme epigenetice*, multiple și interactive: modificări ale structurii histonelor nucleozomale, repoziționarea nucleozomilor și metilarea ADN (vezi capitolul 4.D). Toate aceste modificări epigenetice *trebuie menținute în cursul replicării și generațiilor succesive de celule diferențiate* (memorie epigenetică). Apare astfel o a doua întrebare: cum se realizează transmiterea acestei memorii epigenetice în procesul de replicare? Răspunsurile la cele două întrebări sunt complexe și vom încerca doar sinteza unor elemente explicative.

(1) Așa cum precizam mai sus (vezi subcapitolul 6.1.2), inițierea replicării (în faza G_1) se face în punctele de origine a replicării, regiuni specifice ale ADN pe care se asamblează complexul multiproteic pre-RC. Aceste regiuni au o structură particulară care va permite „deschiderea" ADN bicatenar, fiind lipsite

9. La cele două subunități se atașează și alte proteine (dyskerina, GAR, NPH2, NOP10) care „ajută" activitatea telomerazei; genele care codifică elemente ale acestui complex multi-proteic pot suferi mutații producând „sindroame cu scurtarea telomerelor" (de exemplu, discheratoza congenitală, dar și forme idiopatice de anemie aplastică, fibroză pulmonară, ciroză hepatică).
10. La om, celulele somatice pot produce prin diviziune *maximum 70 de generații celulare;* fac excepție celulele stem pluripotente).

ROMANIAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 6.1

Telomerele și senescența

„Ipoteza telomerică a senescenței" *(Harley, 1991) se bazează pe faptul că, în celulele somatice normale, lungimea secvențelor telomerice repetitive scade cu vârsta (de la 20.000 pb la embrion, la circa 6.000 pb la vârstnic). Acest fenomen a fost demonstrat, atât* in vitro, *cât și* in vivo. *În consecință, lungimea telomerelor poate fi considerată un indicator ce măsoară capacitatea proliferativă restantă a celulei, iar scurtarea progresivă a telomerelor (prin replicarea incompletă) – un biomarker al îmbătrânirii. Astfel, în sindroamele de îmbătrânire accelerată – în* ***sindromul Werner, sindromul Hutchinson-Gilford*** *și alte stări progeroide – telomerele sunt mult mai mici decât la persoane normale de aceeași vârstă.*

Relația dintre scurtarea telomerelor și senescență nu este probabil mecanismul fundamental (și nicidecum unic) al îmbătrânirii. Dar ipoteza este plauzibilă, ca o componentă a îmbătrânirii celulare, și studiul ei poate aduce multe surprize și, de ce nu, acțiuni benefice. De exemplu, (1) încetinirea ratei de scurtare a telomerelor, în celulele și țesuturile normale, ar putea afecta profund vârsta debutului și severitatea multor boli asociate cu vârsta; (2) alungirea ex vivo *a telomerelor în limfocitele T, fibroblastele dermice sau celulele endoteliale (realizată experimental cu vitamina D sau hormoni sexuali) ar putea avea un impact major asupra răspunsului imun în HIV, vindecarea rănilor și poate în bolile cardiovasculare.*

Telomerele, telomeraza și boala canceroasă

În mod cert, telomerele asigură protecția și stabilitatea cromozomilor. Pierderea telomerelor produce rearanjări cromozomiale sau poate duce la pierderea cromozomului respectiv din celulă. Aceasta ar putea explica pierderea heterozigozității locilor pentru genele supresoare ale creșterii tumorale, un mecanism fundamental în cancerogeneză. În plus, s-a constatat că, în cancer, se produce o ***reactivare a telomerazei****, care stabilizează lungimea telomerelor, adăugând secvențele hexamerice specifice, și celulele încep să se dividă activ. Acest fenomen este, foarte probabil, implicat în* imortalizarea celulară[11] *și/sau creșterea continuă a tumorilor (favorizând poate și metastazarea). Desigur, relația dintre reactivarea telomerazei și cancer nu este simplă. În primul rând, existența reală a unor tumori telomerazo-negative arată însă că activarea telomerazei nu este obligatorie pentru formarea/creșterea tumorilor[12]; există, foarte probabil, și alte mecanisme de imortalizare celulară, independente de telomerază. În al doilea rând, producerea cancerului necesită și alte mecanisme celulare, alte mutații adiționale care să determine invazia și metastazarea. În al treilea rând, nu se cunosc mecanismele moleculare de reactivare a telomerazei. Un exemplu este gena c-MYC, care a fost identificată ca reglator esențial al activității TERT. c-MYC interacționează cu promotorul genei TERT, iar mutațiile cu câștig de funcție ale genei c-MYC pot explica, cel puțin parțial, reactivarea activității telomerazice în unele cancere. Se presupune că ar exista gene implicate în represia postnatală normală a telomerazei, care, prin mutație, ar produce reactivarea enzimei. Nu se cunoaște încă rolul telomerelor și telomerazei în transformarea de la tumori benigne la tumori maligne.*

Cu aceste precizări și păstrând un entuziasm ponderat, se poate afirma că determinarea activității telomerazei este un marker pentru diagnosticul precoce al cancerului și pentru evaluarea prognosticului, iar folosirea unor inhibitori ai telomerazei (în special molecule antisens[13] complementare față de componenta ARN a telomerazei umane) ar putea deveni un tratament eficace contra cancerelor. În concluzie, telomeraza îndeplinește multe dintre criteriile pentru o metodă ideală în terapia cancerului și deși există încă multe întrebări fără răspuns despre ipoteza telomerică, optimismul pare justificat.

Cert este că ipoteza telomer – telomerază a îmbătrânirii și cancerului, chiar dacă nu pare perfectă, este seducătoare și, în anii care vin, vom mai auzi cu siguranță multe lucruri noi, care sperăm să fie cât mai benefice practicii medicale în gerontologie și oncologie.

11. De aceea, dispariția postnatală a activității telomerazei ar putea fi considerată un „mecanism de prevenire" a proliferării excesive și anormale a celulelor somatice.
12. Unele cancere care necesită puține mutații pentru a deveni maligne și deci nu implică decât un număr mic de diviziuni celulare ar putea fi telomerazo-negative.
13. Oligonucleotide modificate de tipul „peptide nucleic acids" (PNAs) în care deoxiriboza a fost înlocuită de N-glicină.

de nucleozomi (figura 6.3). Activarea complexului pre-RC, la începutul fazei S, conduce la desfacerea cele două catene ale ADN, formând furca de replicare, datorită unor componente ale complexului, care funcționează ca helicaze sau ca histon-acetil-transferaze, destabilizând interacțiunile dintre ADN și histonele nucleozomale. Se presupune că nucleozomii asociați ADN se detașează în cursul replicării și sunt încorporați (ca urmare a intervenției unor proteine de tip chaperone) în mod egal în ADN nou sintetizat. Deci, fiecare catenă nouă are atât nucleozomi vechi cât și alții noi, iar nucleozomii vechi sunt apoi folosiți pentru a stabili informația epigenetică corectă la nivelul nucleozomilor nou sintetizați Acest model este ipotetic, dar s-a demonstrat că, o dată cu sinteza ADN, are loc în nucleu o sinteză importantă de histone, necesare constituirii de nucleozomi noi.

(2) Menținerea modelului de metilare a ADN în cursul replicării („*memoria epigenetică*") se realizează prin acțiunea *metiltransferazei de menținere DNMT1* care metilează dinucleotidele CpG din catenele ADN ce se formeză în cursul procesului de replicare a ADN; funcția sa este esențială în menținerea modelului de metilare a ADN în succesiunea generațiilor de celule.

DNMT1 acționează la nivelul furcii de replicare a ADN, împreună cu PCNA (antigenul nuclear de proliferare celulară) și mai ales cu proteina UHRF1 (care recunoaște specific dinucleotidele *CpG* hemimetilate) și metilează dinucleotidele *CpG* din catenele ADN nou formate în cursul procesului de replicare a ADN (vezi figura 4.21).

4. Fidelitatea replicării ADN

Acuratețea replicării ADN este critică pentru transmiterea informației ereditare în succesiunea celulelor și organismelor. De aceea, organismul uman posedă numeroase mecanisme care determină ca rata *erorilor de împerechere* („*mismatch*") apărute în cursul procesului de replicare să fie extrem de redusă, mai puțin de o eroare pentru fiecare miliard de nucleotide copiate.

În momentul în care cele două catene ADN sunt separate, nucleotidele activate se aranjează „spontan" și pe bază de complementaritate pe întreaga porțiune a matriței de ADN astfel expusă. Stoichiometria reacției de așezare pe bază de complementaritate permite însă împerecheri greșite (în special de tip G-T) cu o probabilitate de 1 la 10.000. Gradul crescut de fidelitate al replicării este rezultatul unor activități specifice ale ADN-polimerazelor care corectează erorile.

Un prim mecanism prin care ADN-polimerazele ajută la creșterea fidelității replicării îl reprezintă *inserția corectă* a bazelor în catena ADN nou-sintetizată. ADN-polimerazele nu catalizează încorporarea pasivă a oricărui nucleotid, care este deja legat prin punți de hidrogen la catena matriță, ci discriminează activ împotriva unor împerecheri greșite. Recunoașterea erorii se face pe seama *distorsiunii* pe care o produce în diametrul constant, de 2 nm, al moleculei de ADN împerecherea greșită a două nucleotide cu purină (molecule mari) sau două nucleotide cu pirimidină (molecule mici). Această distorsiune acționează ca *semnal* pentru îndepărtarea noii baze inserate greșit. Mecanismul crește acuratețea replicării de aproximativ 100 de ori, reducând rata așteptată a erorilor de la 10^{-4} la aproximativ 10^{-6}.

Un alt mecanism major, responsabil pentru acuratețea replicării ADN, este activitatea de *autocorecție* a ADN-polimerazelor. Aceasta este rezultatul capacității exonucleazice 3'→5' care acționează în sensul opus sintezei ADN și înlătură nucleotidele încorporate greșit în catena nouă. Asemenea activitate exonucleazică 3'→ 5' a fost documentată pentru ADN-polimerazele δ și ε și permite creșterea acurateței replicării ADN de circa 100-1.000 de ori.

În sfârșit, puținele erori de împerechere care apar totuși, în ciuda intervenției mecanismelor mai sus amintite, vor fi ținta unor *mecanisme de reparare a ADN* (în principal sistemul de reparare al erorilor de împerechere) care vor fi discutate în capitolul 7. Lipsa corectării lor va conduce, prin replicări celulare ulterioare, la apariția unor mutații. De exemplu, dacă în dreptul A de pe matriță se va plasa eronat C, în loc de T, la următoarea replicare se va produce substituția perechii de baze A-T cu C-G.

Cert este că integritatea structurală a ADN este extrem de importantă pentru supraviețuire și toate celulele vii au mecanisme evoluate de reparare a leziunilor ADN. Această paradigmă a fost confirmată prin descoperirea unor *sindroame de predispoziție la cancer* care se produc prin mutații ale genelor ce codifică proteinele implicate în reparare. O astfel de genă, care crește (de peste 100 de ori) rata mutațiilor uneia sau mai multor altor gene poartă numele de *genă mutator*. Mutațiile acestor gene determină o predispoziție individuală la unele forme de cancer, cum ar fi cancerul de colon.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B. Transmiterea informației genetice de la o celulă la celulele „fiice"

În celulele somatice, materialul genetic dublat în interfază se distribuie în mod egal și total celulelor noi produse prin procesul de diviziune mitotică. Rezultă două celule „fiice", identice din punct de vedere genetic, atât între ele, cât și cu celula „mamă" din care provin. Procesele prin care o celulă își replică materialul genetic, îl divide egal și îl transferă celulelor fiice se desfășoară într-o ordine progresivă, precis reglată, ce formează **ciclul celular** (figura 6.8). Controlul ciclului celular decide, în ultimă instanță, dacă o celulă își va continua progresia prin ciclu urmând o nouă rundă de diviziune, va trece într-o stare de repaus proliferativ (din care poate evolua spre diferențiere celulară terminală) sau va muri (prin apoptoză).

Cunoașterea proceselor ce alcătuiesc ciclul celular prezintă o importanță deosebită pentru înțelegerea unor mecanisme patogenice generatoare de boli. Pierderea controlului ciclului poate genera *o creștere celulară anormală* (defecte de dezvoltare, celule tumorale). Se pot produce, de asemenea, *erori în segregarea cromozomilor* în mitoză, care vor genera anomalii cromozomiale.

1. Ciclul celular

Ciclul celular reprezintă secvența de evenimente biochimice și morfologice care se produc în viața unei celule, din momentul formării și până la sfârșitul diviziunii sale. Ciclul celular are două mari perioade: *interfaza* și *diviziunea* (tabelul 6.1 și figura 6.8).

Tabelul 6.1. Caracteristicile principale ale fazelor ciclului celular mitotic[14]

Perioada	Faza și durata (ore)	Evenimente	Cantitate ADN	Aspect la microscopul electronic
Interfază	G_1 (10 h)	Sinteză intensă de ARN și proteine	2C	2n cromozomi monocromatidieni
	S (9h)	Sinteză de ADN și histone	4C	
	G_2 (4h)	Sinteza proteinelor fusului de diviziune. Sinteza factorului de declanșare a mitozei	4C	2n cromozomi bicromatidieni despiralați
Diviziune	M (1h)	Profază	4C	Cromozomi bicromatidieni condensați (vizibili la microscopul optic)
		Metafază	4C	
		Anafază	2C 2C	Cromozomi monocromatidieni
		Telofază		

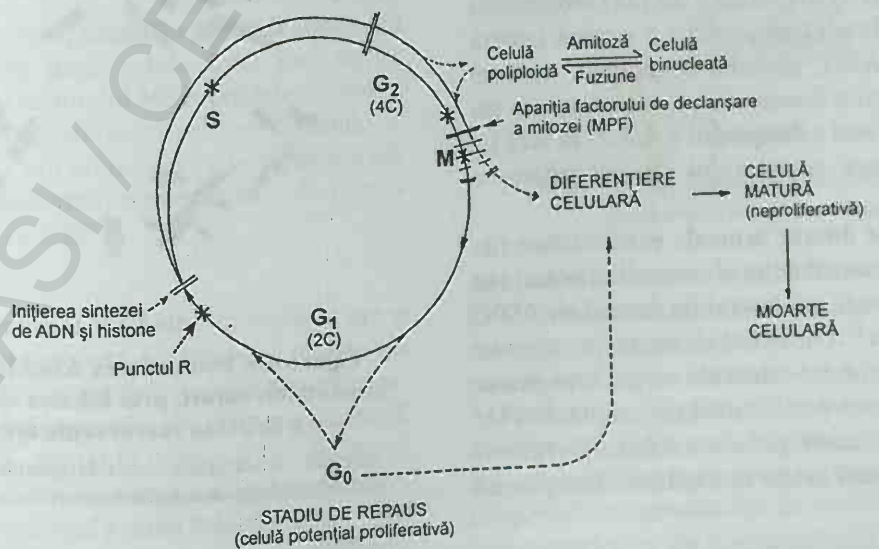


Figura 6.8. Ciclul celular mitotic

14. Ciclul celular meiotic are o serie de particularități (vezi capitolul 6.C.1).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Interfaza reprezintă o perioada lungă cuprinsă între două diviziuni succesive, în care se desfăşoară toate activităţile specifice unei celule. Evenimentul cel mai important al interfazei este *sinteza de ADN* (replicarea), prin care se *dublează cantitatea de material genetic* (2C→4C)[15]. Ea se produce într-o perioadă limitată a interfazei, denumită *faza S*. Datorită acestui proces, interfaza poate fi subdivizată în trei etape succesive: *faza* G_1 (presintetică), *faza S* (de sinteză) şi *faza* G_2 (postsintetică sau premitotică).

Diviziunea celulară sau *faza M* („mitotică") este o perioadă scurtă a ciclului celular, alcătuită dintr-o serie de procese secvenţiale prin care materialul genetic (ADN), replicat în interfază, *se distribuie egal şi total* (segregare cromatidiană) formând doi nuclei distincţi, iar celula se împarte în două celule-fiice (citokineză); acestea vor fi *identice* cu celula din care au provenit. Prin replicarea ADN-ului şi diviziune se asigură *transmiterea fidelă a informaţiei genetice* în succesiunea generaţiilor celulare.

Durata ciclului celular poate varia mult de la un ţesut la altul, datorită variabilităţii fazei G_1, celelalte faze fiind relativ constante. Pentru o durată medie de 24 de ore, timpii aproximativi ai fazelor sunt: G_1 = 10 ore, S = 9 ore, G_2 = 4 ore, M = 1 oră.

1.1. Fazele ciclului celular mitotic

a) Faza G_1

Faza G_1 (G indică, în engleză, *gap – interval*) reprezintă faza de start a ciclului celular, în cazul celulelor stimulate să se dividă (de către factori de creştere). Fiecare cromozom (puternic despiralat) este *monocromatidian*, fiind alcătuit dintr-*o singură moleculă de ADN*. Cantitatea de material genetic este 2C molecule de ADN, sub forma a 2n (46) cromozomi despiralaţi. În faza G_1 se produce o sinteză intensă de substanţe (ARN, proteine structurale, enzime) necesare creşterii şi funcţionării celulei. Aşa cum am arătat mai sus (vezi subcapitolul 6.A.1.2) în faza G_1 are loc formarea complexului de pre-iniţiere a replicării.

În funcţie de diferite semnale extracelulare (de exemplu, TGFβ un inhibitor al creşterii celulare) sau intracelulare (condiţii defavorabile, leziuni ale ADN) celulele pot trece[16] într-o *fază de repaus proliferativ* numită **faza G_0**. Multe celule ale corpului se găsesc în această stare non-proliferativă prelungită. Dar ele nu sunt *inactive*: unele pot urma calea *diferenţierii terminale* devenind celule specializate, îndeplinind o funcţie; alte celule nu urmează această cale şi, ca răspuns la stimuli externi, pot reintra în ciclu şi se divid din nou, pentru a înlocui celulele pierdute (regenerare).

b) Faza S

Faza S (în engleză *synthesis* – sinteză) se caracterizează prin *sinteza de ADN* (realizată prin replicarea semiconservativă) şi *sinteza de histone* (vezi capitolul 6.A). În această fază, cantitatea totală de ADN (2C) trebuie să fie *replicată complet*, dar *numai o singură dată*; se produce astfel o *dublare* a cantităţii de material genetic (4C), condiţie obligatorie pentru desfăşurarea diviziunii celulare. Numărul de cromozomi rămâne 46, dar fiecare cromozom va fi *bicromatidian*, alcătuit din două cromatide identice („*surori*"), deci va conţine două molecule de ADN.

Replicarea ADN în faza S este *asincronă*: unele segmente de ADN (*eucromatina*, bogată în perechi de baze G-C) se replică *precoce*, la începutul fazei S, iar alte segmente (*heterocromatina*, bogată în perechi de baze A-T) se replică *tardiv*, la sfârşitul fazei S.

Uneori, în faza S a ciclului celular mitotic se produce un „schimb egal de material genetic între cromatidele surori" (SCE – în engleză „*sister chromatide exchange*") (figura 6.9 şi caseta 6.2).

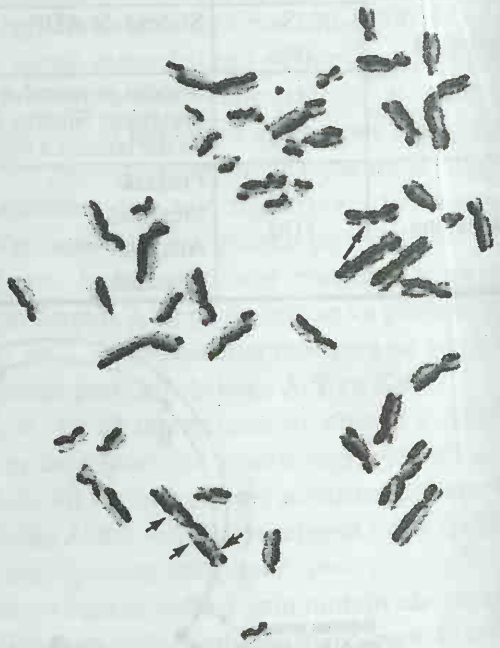


Figura 6.9. Evidenţierea schimburilor între cromatidele surori, prin tehnica de încorporare a BrDU în cursul replicării ADN

Săgeţile indică cromozomii la nivelul cărora există schimburi între cromatidele surori

15. Valoarea C reprezintă cantitatea de ADN a genomului haploid; celulele diploide au 2C până ce intră în faza S.
16. Nu se ştie clar când trec celulele din faza G_1 în faza G_0; probabil în orice moment de la începutul fazei G_1 până la punctul de restricţie R.

BUCUREŞTI NATIONAL MEDICAL LIBRARY

CASETA 6.2

Schimburile dintre cromatidele surori

În faza S a ciclului celular mitotic se poate produce un „schimb egal de material genetic între cromatidele surori" (SCE – „sister chromatide exchange"). Se consideră că, în mod normal, numărul de schimburi nu este mai mare de 7-10 per metafază. Un număr de 14-100 se consideră că este periculos pentru organism în timp ce un număr peste 100 SCE poate fi legat de existența unei tumori sau poate fi întâlnit în sindroame de instabilitate cromozomială (sindromul Bloom). De asemenea numărul lor crește după expunerea organismului la substanțe mutagene, clastogene (ce rup cromozomii) sau carcinogene. Astfel, analiza SCE reprezintă o metodă de evaluare a acțiunii mutagene a diferiților factori chimici sau fizici din mediul ambiant.

SCE poate fi evidențiat prin tehnici speciale. Celulele în cultură efectuează două cicluri de replicare în prezența unui analog al timinei, numit 5-bromodezoxiuridină (BrdU). BrdU se încorporează, în locul timinei, în moleculele de ADN nou sintetizat, modificând proprietățile de colorare ale cromatidelor. Folosind soluția Giemsa sau colorantul fluorescent Hoechst 33258 se colorează cromatida în care numai o catenă a încorporat BrdU (figura 6.9). În zonele în care se produce SCE se observă aspectul particular („arlechin") al cromatidelor, cu zone colorate alternând cu zone necolorate.

c) Faza G_2

Faza G_2 se caracterizează prin sinteza unor proteine specifice necesare mitozei și asigurarea resurselor energetice (ATP) necesare activităților motorii. Fiecare cromozom este *bicromatidian* (cantitatea de ADN este 4C), dar despiralat. Spre sfârșitul fazei G_2 se sintetizează un *„factor de declanșare al mitozei"* (MPF) – reprezentat de complexul Cdk1- ciclina B – ce determină condensarea filamentelor de cromatină în cromozomi și formarea fusului de diviziune.

O demonstrație elegantă a existenței MPF este fenomenul de *„condensare prematură a cromozomilor"*, realizat prin *fuziunea* unei celule în diviziune (metafază) cu o celulă în interfază[17] (figura 6.10); se produce rapid o *condensare* precoce a filamentelor de cromatină interfazică, care în mod obișnuit, sunt puternic despiralate și deci invizibile la microscopul optic, iar membrana nucleară se dezasamblează.

La sfârșitul fazei G_2 există un *punct de control* în care se stabilește dacă celula intră sau nu în diviziune. În lipsa factorului MRF, celulele *se opresc în faza G_2* și pot abandona ciclul celular, formându-se *celule tetraploide* (4n cromozomi); unele dintre ele devin celule binucleate (de exemplu, cardiomiocitele adulte) (figura 6.8).

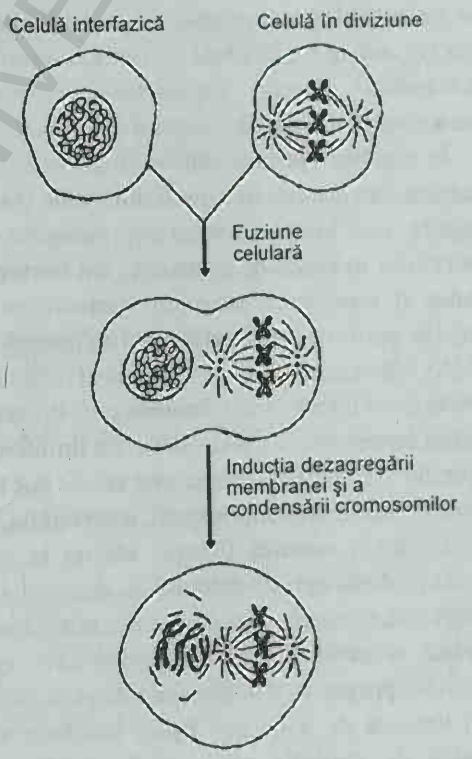


Figura 6.10. Fenomenul de condensare prematură a cromozomilor

d) Faza M

Faza M corespunde diviziunii mitotice și are o durată de aproximativ o oră. Ea începe cu diviziunea nucleului (mitoză) și se termină cu diviziunea citoplasmei (citokineză). Subliniem din nou că, în această etapă, materialul genetic dublat în interfază (4C molecule ADN în 46 cromozomi bicromatidieni) *segregă*, adică *se distribuie în mod egal și total* celulelor „fiice" (2C molecule ADN în 46 cromozomi monocromatidieni), care vor fi astfel identice cu celula din care provin. În mijlocul mitozei există un *punct de control (metafazic)* în care se verifică dacă celula este gata pentru a-și finaliza corect diviziunea.

Procesul de „distribuție" a materialului genetic prin diviziune se desfășoară de obicei cu mare precizie, asigurând *fidelitatea transmiterii informației genetice* în succesiunea generațiilor de celule. El poate suferi însă și *erori*, care vor genera anomalii cromozomiale.

17. Această tehnică se folosește în analiza cromozomilor din nucleul interfazic al spermatozoizilor.

1.2. Evoluția celulelor rezultate prin diviziune

Celulele rezultate după diviziune pot evolua în trei direcții (figura 6.8): (a) *proliferare*, (b) trecerea în *stadiul de repaus* G_0, non-proliferativ sau (c) *senescență și moartea genetică programată (apoptoză)*.

a) Proliferarea

Celulele parcurg un nou ciclu și *se divid repetat*; aceste „celule ciclice" alcătuiesc *compartimentul proliferativ* al organismului și se găsesc în țesuturile embrionare, măduva hematogenă sau stratul bazal al epidermului.

b) Stadiul de repaus, non-proliferativ

Multe celule (de exemplu, celulele „stem" sau limfocitele) părăsesc ciclul celular în faza G_1 (sub acțiunea unui stimul anti-proliferativ, a leziunilor ADN sau a condițiilor nefavorabile de mediu) și *rămân în faza* G_0, având o activitate metabolică minimă, dar păstrându-și deseori capacitatea de diviziune. Aceste celule formează *compartimentul neproliferativ*. În condiții speciale, unele dintre aceste celule reacționează la anumiți stimuli din mediu (factori de creștere, unii hormoni, substanțe mitogene etc.) și pot reintra în ciclul de diviziune. Un exemplu edificator îl reprezintă activarea limfocitelor T din sângele periferic, sub acțiunea fitohemaglutininei (PHA); ele se transformă în limfoblaste, celule tinere, care se divid intens. Acest fenomen este utilizat pentru studiul cromozomilor prin culturi de limfocite (vezi capitolul 2.C.3). Numeroase alte celule pot trece în starea de *diferențiere terminală*, ireversibilă, pentru a îndeplini o anumită funcție; ele nu se mai pot divide și, după un timp determinat, devin senescente și mor. De remarcat faptul că diferențierea celulară implică o serie de *decizii ierarhizate*, celulele devenind progresiv mai specializate și cu capacitate mai limitată de a da alte tipuri celulare; schema clasică de evoluție este: celule totipotente → pluripotente → multipotente → oligopotente → unipotente.

c) Senescența și moartea celulară programată[18]

Datorită fenomenului de scurtare progresivă a telomerelor, leziunilor ADN produse prin stresul oxidativ etc. celulele devin senescente și sunt programate să moară. Moartea celulară programată (MCP) și, în special **apoptoza,** este un fenomen crucial pentru dezvoltarea embrionară și vital pentru funcționarea organismelor mature[19] (vezi capitol 15.A.3).

Apoptoza este declanșată de identificarea unei alterări a componentelor celulare vitale (ADN, mitocondrii), de către sistemele de monitorizare internă, sau de un semnal trimis de alte celule (de exemplu, în cursul dezvoltării embrio-fetale sau supravegherii imune). Moleculele-cheie care execută apoptoza sunt **caspazele** (vezi figura 4.25). Semnalele externe primite de receptori de tip TNF (de exemplu, Fas) duc la activarea *caspazei 8*. Semnalele interne, eliberate de mitocondrii (citocromi c) sau reticulul endoplasmic (Ca^{2+}) produc activarea procaspazei 9. În final, caspazele 8 și 9 activează *caspazele efectoare* 3, 6 și 7 care declanșează modificările celulare caracteristice apoptozei.

De menționat că alterări ale mecanismelor normale ce produc apoptoza se întâlnesc în boli autoimune, boli induse viral sau cancer (vezi capitolul 18).

1.3. Controlul ciclului celular

Progresia ordonată și desfășurarea normală a ciclului celular sunt realizate prin reacții biochimice, în care multiple **kinaze ciclin-dependente (Cdk)**[20] (1-8) sunt *activate*, prin fixarea unor proteine numite **cicline** (A-H)[21]. După *activare*, fiecare complex proteic **Cdk-ciclină** *fosforilează* alte proteine specifice, necesare pentru reacțiile care au loc într-o anumită fază a ciclului. Ulterior, complexul Cdk-ciclină poate fi *inactivat*, determinând trecerea la faza următoare a ciclului celular; inactivarea se poate face fie prin degradarea proteolitică a ciclinei (de către complexul proteazomilor[22], în urma *ubiquitinării*), fie prin intervenția unor **molecule inhibitoare CKI**[23] (*proteinele KIP: p21, p27 sau proteinele INK: p16, p15*).

18. Moartea celulară programată se realizează prin mecanisme variate: apoptoză, autofagie și altele mai rare și mai puțin cunoscute.
19. Pentru „reglarea genetică a dezvoltării și moartea genetică programată" – Sydney Brenner, Robert Horvitz și John Sulston au primit Premiul Nobel în 2002
20. Prescurtarea actuală uzuală a kinazelor ciclin-dependente este **Cdk**.
21. Pentru descoperirea mecanismelor reglării ciclului celular Leland Hartwell, Tim Hunt, Paul Nurse au primit în 2001 Premiul Nobel.
22. **Proteazomii** sunt complexe multiproteice (ce includ și *proteaze*) a căror funcție este degradarea proteolitică a proteinelor ce devin inutile într-un anumit moment sau sunt alterate: ele sunt semnalate prin fixarea unei molecule de *ubiquitină*, de către *ubiquitin-ligaze*. Pentru descoperirea acestor fenomene Aaron Ciechanover, Avram Hershko și Irwin Rose au primit în 2004 Premiul Nobel pentru Chimie.
23. Moleculele **CKI** (de le *Cyclin-dependent Kinase Inhibitors*) sunt de două feluri: *KIP* (de la *kinase inhibitory proteins*) care acționează pe multiple complexe Cdk-ciclină și *INK* (de la *Inhibitors of Cdk*) care acționează specific pe complexul Cdk-ciclina D.

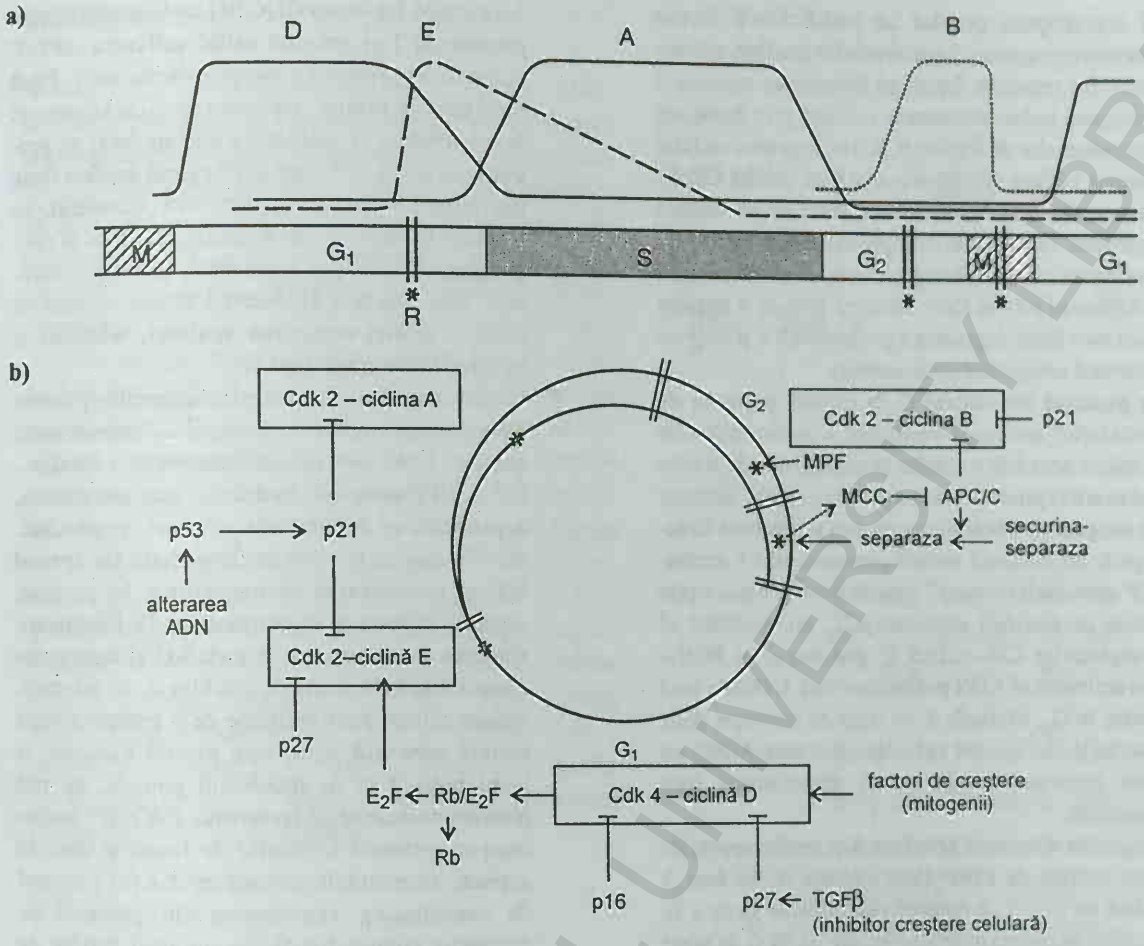


Figura 6.11. Reprezentare schematică a reglării fazelor ciclului celular prin intermediul complexelor Cdk-ciclină

a. Sinteza și degradarea diferitelor tipuri de cicline în decursul fazelor ciclului celular
b. Progresia ordonată prin ciclul celular este reglată de factori activatori → (complexele Cdk-cicline) și factori represori ⊣ (CKI sau inhibitorii de Cdk, p21, p27, p16, p53)

Interacțiunea dintre activarea și inactivarea activităților Cdk, în diferite momente-cheie, asigură *progresia normală și reglarea ciclului celular*. Fiecare fază a ciclului are un *control specific* (figura 6.11), realizat astfel: în G_1, de complexul *Cdk4-ciclină D*; la tranziția G_1/S, de complexul *Cdk2-ciclină E*; în faza S, de complexul *Cdk2-ciclină A*; în fazele G_2 și M, de complexul *Cdk1-ciclină B*.

Tranziția de la o fază la alta a ciclului celular este controlată prin mecanisme specifice, care acționează în anumite **puncte de control** (situate la tranziția G_1/S, intra S, tranziția G_2/M și M). Aici se verifică dacă *procesele caracteristice unei faze sunt realizate corect și terminate înaintea trecerii la faza următoare* sau dacă nu există *alterări* ale ADN, sau ale componentelor „mașinăriilor" de replicare și diviziune mitotică. În cazul identificării unor devieri de la normal sau a unor defecte, se blochează progresia celulei în ciclul celular (prin inactivarea Cdk) și se induce „repararea" sau, dacă aceasta nu este posibilă, *apoptoza*. Prin aceste mecanisme, se asigură creșterea normală și se elimină defectele, care nu vor putea trece astfel la celulele-fiice.

Pe parcursul ciclului celular se produc următoarele evenimente corelate cu reglarea ciclului (figura 6.11):

- În faza „de start" G_1 celulele reacționează la stimuli externi (factori de creștere, mitogeni)[24] formându-se complexul *Cdk4-ciclină D*, care fosforilează și deci activează diferite proteine ce funcționează în această fază. Printre acestea, un rol important îl are *proteina Rb*[25], care (după fosforilare) eliberează un *factor activator* (*E2F*)

24. Stimulii proliferativi se fixează pe receptori de tip RTK și activează calea MAP kinazelor de transducție a semnalului (Ras → Raf → MEK → MAPK → ERK) (vezi figura 4.25); astfel se stimulează expresia genelor ce codifică factorii de transcripție Myc, Fos, Jun care la rândul lor activează genele ce codifică Cdk4 și ciclina D.
25. *Proteina Rb* este codificată de o genă supresoare a creșterii tumorale (gena *RB*), situată pe 13q14, ale cărei mutații pot produce anumite cancere, inclusiv retinoblastoame. În mod normal proteina Rb se leagă de factorul de transcripție E2F și-l inactivează.

al transcripţiei genelor ce codifică alţi factori necesari progresiei ciclului celular (cicline, enzime etc.). De remarcat faptul că factorii de creştere şi mitogenii induc proliferarea celulară prin depăşirea mecanismelor de frânare (CKI) a progresiei ciclului celular în faza G_1 (proteina p16 ce inhibă Cdk4)

- Intrarea în faza S este determinată de un semnal activator reprezentat complexul *Cdk2-ciclină E*. Formarea acestui complex este însă blocată de *inhibitorul p27 al Cdk*; trecerea în faza S implică deci mai întâi degradarea proteolitică a p27 (prin sistemul *ubiquitină-proteazomi*).
- În **punctul de control G_1/S** (numit şi **punct de restricţie**) are loc o verificare a parametrilor de creştere normală a celulei şi condiţiilor de mediu necesare replicării; orice alterare a ADN, depleţie de oxigen/metaboliţi/energie sau perturbare fiziologică, declanşează sinteza *proteinei p53* („gardianul" genomului uman)[26] care activează transcripţia genei ce codifică *proteina p21*, un inhibitor al complexelor Cdk-ciclină E, precum şi al PCNA (un activator al ADN polimerazelor). Celulele sunt oprite în G_0, oferindu-li-se timp de corecţie; dacă alterările (în special cele din structura ADN) nu sunt reparate, celula va fi direcţionată spre *apoptoză*.
- Progresia ulterioară prin faza S şi replicarea ADN sunt reglate de către *Cdk2-ciclina A*. În faza S există *un punct de control suplimentar* în care se verifică existenţa unor alterări ale ADN şi, în acest caz, se blochează activarea secvenţială a unor noi origini de replicare.
- La sfârşitul fazei G2, în **punctul de control G_2/M**, se verifică dacă ADN a fost replicat în întregime, dacă mediul este favorabil şi se decide dacă celula *intră în mitoză*; acest lucru este determinat de activarea bruscă a complexului *Cdk1-ciclină B* (ce reprezintă *factorul MPF*); acest complex determină formarea fusului de diviziune, condensarea cromatinei în cromozomi, disoluţia membranei nucleare şi iniţierea profazei. Celulele cu aberaţii cromozomiale sau defecte ale aparatului mitotic sunt oprite să intre în mitoză (prin acţiunea p53 şi p21, care blochează formarea complexului Cdk1-ciclină B).
- În cursul mitozei, în metafază, mai există un **punct de control M** („mitotic" sau „metafazic" sau „de asamblare a fusului"), în care diviziunea se opreşte şi se verifică dacă *toţi cromozomii sunt ataşaţi corect la fusul de diviziune şi aliniaţi perfect în placa metafazică* înainte de a începe anafaza. Ataşarea incorectă a microtubulilor fusului de diviziune la kinetocori sau absenţa ataşării declanşează un semnal (produs de proteinele complexului MCC – *complexul punctului de control mitotic*) care inhibă fosfataza CDC20 („*cell-division cycle protein 20*") şi previne astfel activarea *APC/C* („*anaphase-promoting complex/ciclozom*"). Dacă totul este „în ordine" (ataşarea ambilor kinetocori la microtubuli şi orientarea lor bipolară) se produce *activarea APC* care declanşează anafaza (prin degradarea *securinei* şi activarea *separazei*, ce clivează moleculele de adeziune, coezina şi condensina, ce ţin ataşate cromatidele surori la centromer, vezi caseta 2.3); această ultimă acţiune va permite celulei realizarea anafazei, telofazei şi trecerea într-o nouă fază G_1.
- Un rol important în controlul diferitelor procese din cursul mitozei îl are „*complexul cromozomial călător*" („*the chromosomal passenger complex-CPC*). CPC intervine în diferite faze ale mitozei, deplasându-se în anumite situsuri, producând: modificarea histonelor nucleozomale (în special H3) şi condensarea cromozomilor, în profază; ataşarea corectă a microtubulilor la kinetocori, alinierea cromozomilor în metafază şi segregarea cromatidiană, în anafază; citokineza, în telofază. Aceste acţiuni sunt realizate de o protein-kinază numită *aurora-B*, care este plasată dinamic, la locul potrivit şi în momentul potrivit, de trei proteine neenzimatice (*survivina*, *INCENP*, *borealina*) ce recunosc situsurile de fixare şi deci de acţiune: cromatidele cromozomului (în procesul de condensare), centromerul (în procesul de disjuncţie cromatidiană) sau mijlocul fusului de diviziune (în citokineză).

Proliferarea celulară este reglată pe o durată limitată de *factori extracelulari* (hormoni, factori de creştere etc.), precum şi de anumite *gene de proliferare* sau „mitogene" (ce codifică cicline, receptori ai factorilor de creştere, proteine necesare sintezei de ADN etc.). Deoarece, prin mutaţia şi activarea lor anormală, se produce o proliferare celulară aberantă şi cancer, aceste gene normale mai sunt numite şi **proto-oncogene**. O altă categorie de gene, numite *antiproliferative*, au rolul de a inhiba proliferarea celulară. De aceea, aceste gene mai sunt numite gene **supresoare ale creşterii tumorale**[27] sau **antioncogene** (vezi capitolul 18).

În *cancer*, se produce o perturbare a desfăşurării normale a ciclului celular. Celulele canceroase, purtătoare de mutaţii, „scapă" de sub controlul mecanismelor care reglează proliferarea normală, parcurg rapid şi repetat ciclul celular, multiplicându-se permanent şi anarhic. Multe medicamente anticanceroase (citostatice) determină „blocarea" proliferării celulelor, prin oprirea evoluţiei lor în diferite faze ale ciclului celular.

26. p53 este codificată de gena *TP53*, o genă supresoare de tumori; mutaţiile ei se regăsesc în peste 60% din cancere.
27. Considerăm că această denumire este mai corectă în limba română decât „gene supresoare de tumori", deoarece genele nu suprimă o tumoare, ci previn creşterea tumorală.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Mitoza

Mitoza este o diviziune caracteristică celulelor somatice ale organismului. Ea asigură *creșterea* biomasei organismului, care, între stadiul de zigot unicelular și cel de organism adult, necesită 1×10^{14} diviziuni celulare. În unele țesuturi, cum ar fi măduva hematogenă sau țesutul epitelial, mitoza se desfășoară continuu, pe tot parcursul vieții, asigurând *reînnoirea* celulară, *regenerarea*, dar și *repararea* unor leziuni tisulare.

Prin mitoză, materialul genetic dublat în interfază se distribuie *total* și *egal* celulelor-fiice. Mitoza este o diviziune ecuațională, deoarece din celula inițială (celula „mamă") cu 46 cromozomi, rezultă două celule „fiice" care au, de asemenea, 46 cromozomi (celule diploide). Mitoza permite *transmiterea cu mare fidelitate a informației genetice* în succesiunea generațiilor de celule, ceea ce asigură *stabilitatea proceselor ereditare*. De asemenea, în mitoză, prin mecanisme epigenetice de „marcare a genelor active" („*gene bookmarking*"; vezi subcapitolul 4.D.1.2) se asigură transmiterea la celulele fiice a „*memoriei celulare*" a genelor care erau active înainte de mitoză, pentru a menține fenotipul particular (diferențierea) liniei celulare.

2.1. Fazele mitozei

Mitoza este un proces continuu, care durează circa o oră, și se desfășoară în cinci etape succesive: profaza, prometafaza, metafaza, anafaza și telofaza (figura 6.12). Fiecare dintre aceste faze sunt definite prin *comportamentul cromozomilor* și distribuția conținutului citoplasmatic, iar desfășurarea lor este riguros *controlată* pentru a se asigura că fiecare celulă-fiică va primi o copie exactă a genomului parental. Orice eroare de distribuție va genera anomalii cromozomiale la celulele fiice.

a) Profaza

La începutul profazei, în celule pot fi observate o serie de fenomene nucleare și citoplasmatice

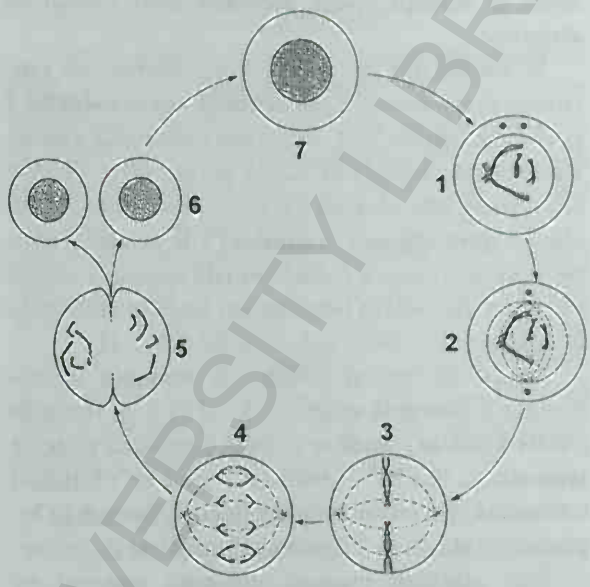


Figura 6.12. Fazele mitozei

(adaptat după Thompson, 1991)

Reprezentare diagramatică pentru o celulă ipotetică cu două perechi de cromozomi:
1 – *Profaza*; 2 – *Prometafaza*; 3 – *Metafaza*; 4 – *Anafaza*; 5 – *Telofaza*; 6 – *Diachineza*; 7 – *Interfaza*

În citoplasmă, în apropierea nucleului, se găsește **centrozomul** (alcătuit dintr-o pereche de *centrioli*), organit esențial pentru formarea **fusului de diviziune**. O celulă moștenește după diviziune un centrozom care se replică în interfază formând o pereche de centrozomi; la începutul profazei, cei doi centrozomi se separă și fiecare produce (prin polimerizarea tubulinei α și β) *microtubulii* din care sunt formate filamentele fusului de diviziune (fibre polare sau

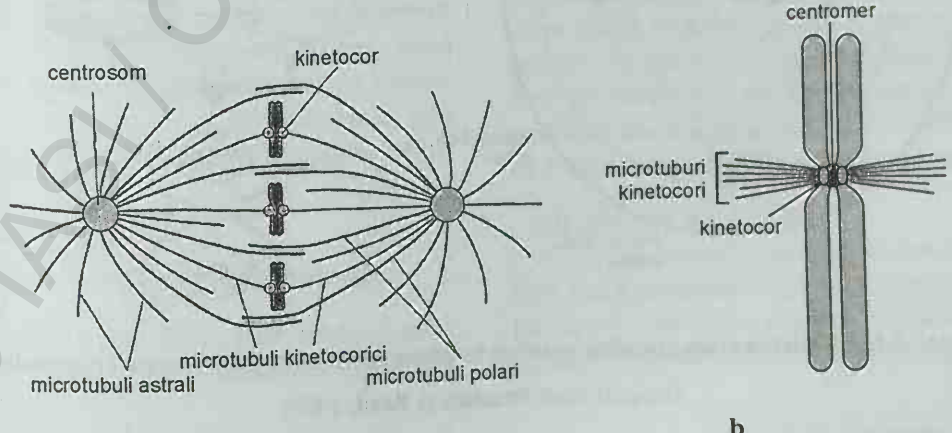


Figura 6.13. Fusul de diviziune mitotică

a. Fusul mitotic. Diferite clase de microtubuli
b. Fixarea microtubulilor la cromozomul metafazic

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

centriolo-centriolare şi fibre kinetocorice sau centriolo-cromozomiale) (figura 6.13.a). Pe măsura dezvoltării acestor fibre cei doi centrozomi se deplasează în direcţii opuse, formând *polii fusului de diviziune.*

În nucleu are loc *condensarea fibrelor de cromatină în cromozomi*, sub acţiunea **condensinelor I şi II** (vezi caseta 2.3). Deoarece materialul genetic s-a replicat (dublat) în faza S a interfazei, fiecare cromozom este alcătuit din două *cromatide surori*, ataşate (prin acţiunea **coezinelor**)[28] la nivelul *centromerului*, o structură cromozomială esenţială pentru a asigura *distribuţia* (segregarea) fiecărei cromatide în celulele-fiice (vezi subcapitolul 2.C.3.1).

Fiecare cromatidă conţine, în regiunea centromerului, o secvenţă specifică de ADN înalt repetitiv (ADN α-satelit), unde se fixează complexe proteice specializate (CENP – „*centromer protein*") formând o structură specială numită **kinetocor** (figura 6.13.b), pe care se ataşează filamentele fusului de diviziune.

Spre sfârşitul profazei nucleolii diminuă ca mărime şi în cele din urmă se dezintegrează.

b) Prometafaza

Prometafaza începe cu *dezasamblarea membranei nucleare*, datorată disocierii *laminei nucleare* în subunităţi de *lamină*. Simultan are loc şi dezintegrarea reticulului endoplasmatic şi a aparatului Golgi. Dezintegrarea membranei nucleare este urmată de deplasarea fusului mitotic în aria pe care a ocupat-o nucleul. Începe *procesul de „captare" a cromozomilor*: fibrele centriolo-cromozomiale „caută" kinetocorii cromozomilor pentru a se ataşa de ei, legând centromerul fiecărui cromozom de polii fusului de diviziune.

c) Metafaza

În metafaza propriu-zisă, prin intermediul unor „proteinelor motor"[29], asociate cu microtubulii fusului, cromozomii bicromatidieni sunt mişcaţi pentru a fi *aliniaţi*, independent unul de altul, la ecuatorul fusului de diviziune, în acelaşi plan (în lungul liniei mediane), formând aşa-numita **placă metafazică**; alinierea este o condiţie obligatorie pentru segregarea cromatidiană corectă.

În metafază există un *punct de control M* („mitotic" sau „metafazic" sau „de asamblare a fusului") (figura 6.11) în care diviziunea se opreşte şi, înainte de a începe anafaza, se verifică dacă *toţi cromozomii sunt ataşaţi corect la fusul de diviziune şi aliniaţi perfect în placa metafazică*. Dacă totul este „în ordine" (ataşarea ambilor kinetocori la microtubuli şi orientarea lor bipolară; figura 6.14) se produce *activarea APC/C* („*anaphase-promoting complex/ciclozom*") şi declanşarea anafazei. Ataşarea incorectă a microtubulilor fusului de diviziune la kinetocori sau absenţa ataşării declanşează semnale (produse de

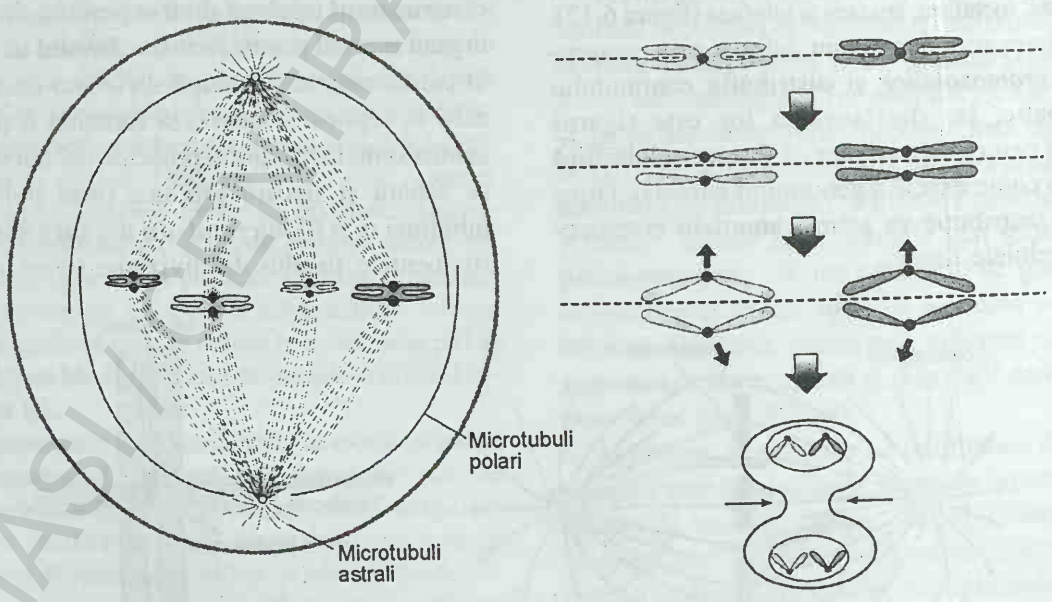


Figura 6.14. Alinierea cromozomilor omologi în placa metafazică şi disjuncţia cromatidiană

(adaptat după Strachan şi Read, 1999)

28. Perturbarea procesului de formare a coezinelor a fost demonstrată în sindromul Cornelia de Lange (hipostatură, microcefalie, dismorfie facială, retard mental) şi sindromului Robert (hipostatură, retard mental, focomelie) – reunite în grupul „**coezinopatiilor**".

29. Proteinele motor (de exemplu, MAPK) sau „motoarele moleculare" convertesc energia ATP în mişcare.

RCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

proteinele[30] complexului MCC – *complexul punctului de control mitotic*) care inhibă fosfataza CDC20 și previne astfel activarea *APC/C*.

d) Anafaza

Anafaza începe brusc cu *separarea cromatidelor surori*, simultan la toți cromozomii, prin activarea APC care determină clivarea proteolitică a coezinei (proteina ce atașează cromatidele la centromer) de către *separază*. Prin acest proces de **disjuncție (segregare) cromatidiană**, fiecare cromozom bicromatidian formează doi cromozomi monocromatidieni.

La începutul mitozei, prin acțiunea Cdk1-ciclina B, *separaza* este cuplată cu *securina* și menținută în formă inactivă. La începutul anafazei prin activarea APC se produce activarea separazei (prin proteoliza securinei și degradarea ciclinei B); aceasta desface inelul de *coezină* ce ține atașate cromatidele surori la centromer.

După separare, *fiecare cromozom monocromatidian este tras spre centrozomii* (cu care rămâne atașat prin microtubuli) situați la polii opuși ai fusului de diviziune, prin scurtarea fibrelor centriolo-cromozomiale; deplasarea spre poli se face *simultan și cu aceeași viteză* pentru toți cromozomii. Astfel, se produce împărțirea *totală și egală* a materialului genetic între celulele-fiice.

Fibrele polare (centriolo-centriolare sau nekinetocorice) se alungesc (prin polimerizare de noi microtubuli) și împing centrozomii și cromozomii spre polii opuși ai fusului de diviziune, pentru a forma noi nuclei.

e) Telofaza

Se caracterizează prin evenimente opuse celor din profază: cromozomii celor doi noi nuclei suferă un proces de *decondensare* și *despiralare*, fusul de diviziune se dezasamblează, se refac membranele ce delimitează nucleul, reticulul endoplasmic și aparatul Golgi. Începe diviziunea citoplasmei (**citokineză**) prin acțiunea continuă a unui inel contractil de *actină*, care produce împărțirea citoplasmei, și cele două celule-fiice se separă, fiecare conținând *2n cromozomi monocromatidieni*, cu aspect interfazic, și o cantitate aproximativ egală din masa citoplasmatică.

2.2. *Erori de distribuție a materialului genetic în mitoză*

Principalele erori de distribuție a materialului genetic în mitoză sunt: nedisjuncția cromatidiană, întârzierea anafazică și clivarea transversală a centromerului. Ele generează anomalii cromozomiale în țesuturile somatice (vezi capitolele 8.B.1 și 11.C).

a) Nedisjuncția cromatidiană

Nedisjuncția cromatidiană apare atunci când cele două cromatide ale unui cromozom *nu se separă* în timpul anafazei mitozei, ci rămân unite și migrează *împreună* în una din cele două celule-fiice. Consecința acestei erori este apariția unor celule anormale: una *trisomică*, cu un cromozom în plus (2n+1=47 cromozomi), alta *monosomică* cu cromozomul respectiv lipsă (2n–1=45 cromozomi). Studii recente demonstrează că acest fenomen este *frecvent și important* la om, începe precoce la embrion (în stadiul de clivare, de 8 celule) și continuă toată viața (determinând diferite diferite grade de mozaicism cromozomial, prezent în aproape toate țesuturile).

b) Întârzierea anafazică

Întârzierea anafazică constă în *migrarea cu întârziere* a unui cromozom monocromatidian, care în momentul formării membranelor nucleare va rămâne în afara nucleelor celulelor-fiice și va fi înconjurat de o membrană proprie. El formează un „*micronucleu*" care dispare la următoarea diviziune. Rezultă clone celulare cu 2n–1 / 2n, adică 45/46 cromozomi. Prezența micronucleilor (ce se formează din cromozomi care nu au migrat și care nu au fost incluși în nici unul dintre nucleii-fii), indică tulburări ale desfășurării mitozei, ce pot fi produse de cauze externe. De aceea, **testul micronucleilor** este utilizat pentru studiul efectelor cromozomiale produse de radiațiile ionizante sau alți factori mutageni.

c) Clivarea transversală a centromerului

Clivarea *transversală* a centromerului[31] produce **izocromozomi** („*cromozomi cu brațe egale*") alcătuiți numai din brațe scurte (p) sau numai din brațe lungi (q). Acești cromozomi anormali au duplicate genele de pe brațul prezent și le lipsesc genele de pe brațul pierdut. În patologia umană au fost descriși mai frecvent izocromozomi Xp sau Xq în disgeneziile gonadale sau i(12p) în *sindromul Pallister-Killian*, cu anomalii congenitale multiple și retard mental.

d) Absența citokinezei

Celulele somatice, după duplicarea ADN în interfază, au 2n cromozomi bicromatidieni (4C). Dacă are loc mitoza, dar nu se produce citokineza, rezultă o celulă *tetraploidă* cu 4n cromozomi monocromatidieni

30. Complexul MCC include numeroase proteine: MAD2 , MAD3 și BUB3, Aurora B ș.a ce detectează neatașarea microtubulilor la kinetocorii sau absența orientării și tracțiunii bipolare a kinetocorilor.

31. În metafază cromozomii bicromatidieni se aliniază la ecuatorul celulei în același plan, iar cromatidele surori se dispun *paralel* cu linia mediană; dacă accidental cromozomul se dispune în *unghi drept* față de poziția normală centromerul este divizat în plan opus față de ceilalți cromozomi și rezultă doi izocromozomi, de brațe scurte și de brațe lungi.

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

(4C). Acest proces, numit şi *endomitoză*, se observă, în mod fiziologic, în procesul de regenerare hepatică sau în cursul formării megacariocitelor.

e) Consecinţele erorilor mitotice

Erorile de distribuţie a materialului genetic în mitoză determină apariţia unor anomalii de număr, mai rar de structură, ale cromozomilor în celulele-fiice. Cercetări recente au arătat că aceste erori sunt surprinzător de frecvente şi importante; ele au consecinţe majore asupra evoluţiei celulelor, influenţând *viabilitatea şi capacitatea lor de multiplicare*. Aceşti parametri depind mai ales de cromozomul afectat şi de tipul de anomalie cromozomială (trisomie sau monosomie) produsă. Dacă modificările sunt grave se declanşează apoptoza. Dacă celulele rezultate sunt viabile şi se multiplică ulterior, formează o **clonă** anormală (un grup de celule ce au o particularitate comună şi provin, prin mitoze repetate, dintr-o celulă iniţială modificată), iar în organism apar **mozaicuri cromozomiale**, definite ca diferenţe intercelulare a conţinutului de cromozomi la *acelaşi individ*.

Apariţia unor clone celulare anormale la un organism, prin oricare dintre erorile amintite, determină efecte diferite în raport cu *momentul ontogenetic* în care s-a produs accidentul (şi deci cu proporţia celulelor anormale care se formează). Perturbarea precoce şi apariţia unui număr mare de celule cu anomalii cromozomiale în primele stadii de dezvoltare embrionară au consecinţe negative majore: fie avorturi spontane[32], fie nou-născuţi cu anomalii congenitale; se întâlnesc mai frecvent în sindromul Turner (25% din cazuri), sindromul Down (2-4% dintre bolnavi) şi sindromul Klinefelter (vezi capitolul 10.C). Un alt factor ce influenţează efectele fenotipice ale clonelor anormale este *distribuţia* lor în diferite ţesuturi. A fost descris, de exemplu, un *mozaicism limitat la placentă*, cu un făt euploid, iar mai recent *un mozaicism limitat la SNC* (responsabil de unele boli neurodegenerative) sau la *ovar* (asociat cu riscul crescut de ovocite aneuploide; vezi meioza).

C. Transmiterea informaţiei genetice de la părinţi la descendenţi

Transmiterea informaţiei genetice în succesiunea generaţiilor de organisme este un proces complex care se desfăşoară în două etape: *formarea gameţilor*, celule sexuale mature cu un număr haploid de 23 cromozomi, şi *fecundarea lor*, care reface la zigot numărul diploid de 46 de cromozomi, caracteristic speciei umane, şi realizează *o structură genetică nouă, unică şi constantă* (individualitatea genetică) caracteristică viitorului individ. Ambele etape se efectuează de obicei cu mare precizie, dar uneori se pot produce *erori* care generează anomalii genetice.

1. Gametogeneza

Gametogeneza (producţia de gameţi, spermatozoizi şi ovule) are loc în *gonade*, prin *meioză* – un tip special de diviziune reducţională, care asigură transmiterea informaţiei genetice la generaţia următoare şi îndeplineşte două funcţii majore:

- *reduce la jumătate (n=23) numărul de cromozomi* şi asigură astfel, după fecundare, menţinerea constantă a numărului de cromozomi ai speciei (2n=46);
- creează *diversitatea genetică* ce apare la copiii născuţi din aceiaşi părinţi[33], prin fenomenele de recombinare genică (din profaza I) şi recombinare inter-cromozomială (din anafaza I), meioza fiind principala sursă de variabilitate genetică.

1.1. Caracterele generale ale meiozei

Meioza este un proces complex care se realizează prin *două diviziuni succesive*: meioza I (diviziunea meiotică primară, heterotipică, *reducţională*) şi meioza II (diviziunea meiotică secundară, homotipică, *ecvaţională*), neseparate de interfază, *ADN replicându-se numai o singură dată*. Meioza începe cu o celulă diploidă (ce conţine două copii bicromatidiene ale fiecărui cromozom) şi produce patru celule haploide, care au o singură copie monocromatidiană a fiecărui cromozom, cu un „*amestec unic*" de material matern şi patern.

Desfăşurarea corectă a meiozei este esenţială pentru menţinerea integrităţii genomului, fertilitate şi dezvoltarea normală a urmaşilor.

32. Circa 25% din embrionii avortaţi spontan au mozaicuri aneuploide.
33. În acest context, termenul de „*reproducere*" este oarecum impropriu pentru că individul ce rezultă după fecundare nu este o *copia* nici unuia dintre părinţi.

a) Meioza I

Este o formă specială de diviziune celulară[34] (caracteristică gametocitelor primare), unică și foarte complexă, cu o durată lungă, în special la organismele feminine. Prezintă patru etape: profaza I, metafaza I, anafaza I, telofaza I, fiecare cu anumite particularități (figura 6.15.a).

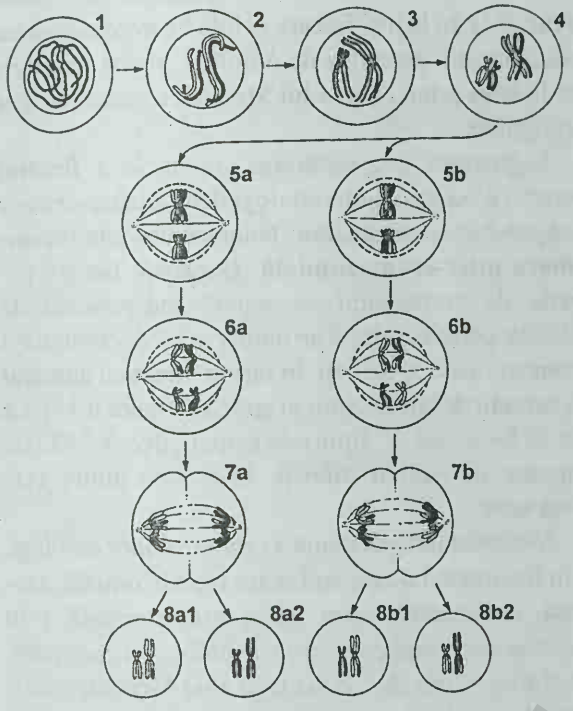


Figura 6.15.a. Fazele meiozei I

(modificat după Thompson, 1991)

Reprezentare diagramatică a două perechi de cromozomi și a unui *crossing-over*. 1-4 profaza; 5a, 5b posibilitățile de aranjare a celor două perechi de cromozomi în metafază; 6a, 6b anafaza; 7a, 7b telofaza; 8a1, 8a2, 8b1,8b2 combinațiile posibile ale cromozomilor parentali.

(1) Profaza I este foarte lungă (90% din durata meiozei I) și cuprinde cinci stadii:

- **Leptoten**. Prin condensarea fibrelor de cromatină, cromozomii devin vizibili ca *filamente subțiri și lungi*, atașate prin telomere la membrana nucleară. Deși cromozomii sunt bicromatidieni, datorită lungimii mari și grosimii lor mici, ei apar la microscopul optic ca fiind *monocromatidieni*.
- **Zigoten**. Cromozomii omologi (matern și patern) se apropie unul de altul (printr-un mecanism puțin cunoscut), se *împerechează* și se atașează paralel de-a lungul cromatidelor, fenomen numit *sinapsă* sau *conjugare cromozomială*; se realizează astfel o aliniere *„genă la genă"* sau, mai exact, o împerechere între secvențele omoloage, rezultând structuri numite **bivalenți** (în realitate, fiecare unitate este o *tetradă*, deoarece prezintă patru cromatide). Cromozomii omologi sunt *uniți „margine la margine"*[35] în anumite regiuni, prin intermediul **complexului sinaptonemal**, vizibil la microscopul electronic.

  Complexul sinaptonemal este o structură proteică complexă care se formează între cei doi cromozomi omologi, mediind sinapsa și recombinarea lor. Prezintă un element central (alcătuit de proteina SYCP1), legat la două elemente laterale (formate din *coezinele SMC1 și SMC3* precum și din proteinele de recombinare REC8, RAD21), pe care se fixează fibrele de cromatină ale fiecărui cromozom

O excepție de la acest model de sinapsă este prezentă la sexul masculin, la care cromozomii X și Y, nefiind omologi, fac sinapsă „cap la cap", printr-o mică regiune omoloagă („regiune pseudo-autozomală") aflată la capătul brațelor scurte, și formează, prin condensare, o structură specifică – *vezicula sexuală*.

- **Pahiten**. Cromozomii se scurtează și se îngroașă. Din loc în loc, devin vizibile niște puncte mai intens colorate numite *cromomere*, a căror număr și poziție sunt caracteristice fiecărui cromozom[36]. În faza de pahiten are loc fenomenul de **încrucișare cromozomială** între cromozomii omologi – sau **crossing-over** (CO) în limba engleză – care constă în „secționarea" cromatidelor *nesurori* ale omologilor, *exact în același punct* și *schimbarea reciprocă* (încrucișată) a unor *fragmente egale* (**„recombinare omoloagă"**)[37]. Astfel, un fragment de cromatidă de pe un cromozom matern se *transferă* pe omologul său patern și invers, realizând *o nouă combinație genică* cu material genetic de la ambii părinți (*cromozomi recombinanți*). Se realizează deci o recombinare genică (intra-cromozomială), ce reprezintă o *sursă de variabilitate*

34. Există două diferențe majore între meioză și mitoză: prin meioză rezultă celule *haploide*, care genetic sunt *diferite*. În plus, meioza este un proces cu „sens unic" deoarece celulele rezultate nu se mai pot angaja într-un nou ciclu celular. Mai menționăm că meioza I este precedată de o interfază cu fazele G_1 și S, identice ca la mitoză, dar fără G_2, iar meioza II nu este precedată de interfază; de aceea ADN se replică o singură dată.
35. Alinierea/împerecherea cromozomilor omologi „margine la margine" la nivelul sinapselor este favorizată de secvențele repetitive multiple și identice ca tip și localizare din cei doi cromozomi omologi.
36. Dispoziția cromomerelor coincide cu cea a benzilor G (vezi capitolul **Cromozomii umani**).
37. Mecanismul molecular al recombinării la om este foarte complex și implică numeroase enzime care taie (Spo 11), schimbă și resudează fragmentele de cromozomi (recombinazele Dmc1 și Rad51). Vom reveni în capitolul 6 deoarece *recombinarea omologă* este și o cale de reparare a leziunilor ADN și de menținere a integrității genomice.

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

genetică, datorită noilor combinații de gene care apar (prin CO) și se transmit la descendenți (vezi capitolul 3.A.2.2).

La om se produce cel puțin un CO pentru fiecare braț cromozomial (exceptând acrocentricii). În meioza masculină, numărul total al recombinărilor este de circa 50 per celulă, în timp ce meioza feminină se caracterizează printr-un număr mai mare de recombinări (aproximativ 70 per celulă).

- **Diploten**. Complexele sinaptonemale *se degradează* și cromozomii omologi încep să se separe longitudinal (*desinapsă*), ca și cum „s-ar respinge" reciproc. Cromatidele lor rămân în contact la nivelul anumitor puncte („*chiasmata*", pluralul de la „*chiasma*") care marchează localizarea *crossing-over*-ului.

  Datorită conexiunilor (chiasmata) între cromozomii omologi, ei rămân atașați în anumite puncte până spre sfârșitul metafazei și sunt orientați bipolar (în poziții opuse) pe filamentele fusului de diviziune. Coeziunea între cromatidele surori realizată prin *chiasmata*, coezine și alte proteine este esențială pentru segregarea corectă a cromozomilor omologi. Absența sau alterarea CO determină[38] o disociere prematură a omologilor, *segregare întâmplătoare în meioza I* și anomalii cromozomiale.

- **Diakineza**. Cromozomii devin mai scurți și mai groși, omologii se separă aproape complet, rămânând atașați numai la capetele lor (*terminalizarea chiasmatelor*). În această fază, se observă clar că fiecare bivalent conține patru elemente (rezultând o „*tetradă*"): cromatidele surori sunt unite prin centromer, iar cromatidele nesurori sunt unite prin chiasmele la nivelul cărora s-a produs *crossing-over*-ul.

La sfârșitul profazei, la fel ca în prometafaza mitozei, nucleolii dispar, membrana nucleară se dezintegrează, începe formarea fusului de diviziune și atașarea microtubulilor la kinetocori[39].

(2) Metafaza I. Bivalenții, formați din cromozomi bicromatidieni, se fixează cu centromerul pe filamentele fusului și se deplasează spre placa metafazică, la ecuatorul celulei, fiind în mod normal *orientați bipolar* pe filamentele fusului de diviziune. Centromerii cromozomilor omologi se dispun (aliniază) *aleatoriu* de o parte și de alta a planului ecuatorial.

(3) Anafaza I cuprinde un fenomen genetic foarte important: **disjuncția cromozomială**. Cei doi cromozomi bicromatidieni ai fiecărui bivalent *se separă* și se repartizează câte unul la fiecare celulă fiică. Spre deosebire de mitoză, *cromatidele surori nu se despart*, ci rămân atașate la nivelul centromerului. Apoi are loc *migrarea anafazică*, prin deplasarea cromozomilor (bicromatidieni), simultan și cu aceeași viteză, spre polii opuși ai celulei. În final, se realizează *o reducere* a numărului de cromozomi de la 2n la n și fiecare celulă va avea numai un exemplar din perechea de omologi. Acest fenomen stă la baza primei legi a lui Mendel, numită și *legea segregării*.

Segregarea sau separarea *aleatorie* a fiecărei perechi de cromozomi omologi determină *asortarea independentă a omologilor*, fenomen denumit **recombinare inter-cromozomială**. Deoarece fiecare pereche de cromozomi se separă independent de celelalte perechi, rezultă un număr mare de combinații cromozomiale în gameți, în raport direct cu numărul de perechi de cromozomi ai speciei (figura 6.16). La om se formează 2^{23} tipuri de gameți, deci 8.388.608 variante de gameți diferiți, la fiecare dintre cele două sexe.

Asortarea independentă a cromozomilor omologi, prin fenomenul de recombinare cromozomială, asociată cu recombinarea intra-cromozomială prin *crossing-over*, *explică marea variabilitate a gameților*. Ea confirmă cea de-a doua lege a lui Mendel, referitoare la *combinarea liberă a „factorilor ereditari"* (genelor), astfel că fiecare gamet care rezultă în urma meiozei are un set unic de gene, diferit de al celorlalți. Prin combinarea, pe bază de probabilitate, a gameților masculini cu cei feminini, în procesul de fecundare are loc formarea unor *zigoți diferiți din punct de vedere genetic*, iar indivizii rezultați vor fi **unicate genetice**.

(4) Telofaza I. Are loc reasamblarea nucleilor; citokineza se realizează fără separarea completă a celulelor-fiice (două spermatocite secundare, la bărbat; un ovocit secundar și un prim globul polar, la femeie), care rămân atașate printr-o punte citoplasmatică, formând o *diadă*.

b) Meioza II

Meioza II[40] nu este precedată de replicarea ADN și se aseamănă cu o diviziune mitotică, dar care se realizează în celule cu număr haploid de 23 de cromozomi bicromatidieni (dintre care unii sunt recombinanți). Este deci o *diviziune homotipică*,

38. La bărbații cu sterilitate există un număr semnificativ mai mic de CO.
39. Există patru kinetocori pe fiecare tetradă, dar perechea de kinetocori a cromatidelor surori fuzionează și funcționează ca o unitate în cursul meiozei I; ei vor tracționa cromozomii atașați la microtubuli spre polii fusului de diviziune.
40. Meioza II începe la bărbat aproape imediat după terminarea meiozei I și produce patru spermatide haploide; la femeie, meioza II este coordonată cu ovulația și fecundarea, formând un ovocit și un al doilea globul polar.

BCU "IULIU HAȚIEGANU" CENTRUL UNIVERSITAR

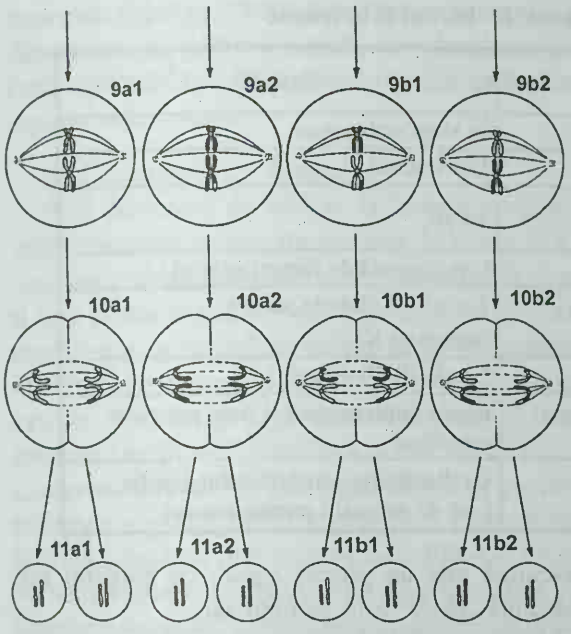


Figura 6.15.b. Fazele meiozei II

(modificat după Thompson, 1991)

9a1, 9a2, 9b1,9b2 metafaza; 10a1, 10a2, 10b1,10b2 anafaza; 11a1, 11a2, 11b1, 11b2 cele 8 combinații cromozomiale posibile în gameți.

ecuațională. Ea prezintă patru stadii: profaza II, metafaza II, anafaza II și telofaza II (figura 6.15.b).

(1) Profaza II. Cromozomii bicromatidieni se individualizează, cromatidele surori devin vizibile distinct, iar membrana nucleară dispare.

(2) Metafaza II. Cromozomii se condensează și se atașează fiecare pe câte un filament al fusului de diviziune, aliniindu-se în *placa metafazică ecuatorială*.

(3) Anafaza II. Prin diviziunea centromerelor, numită *disjuncție cromatidiană,* fiecare cromozom se separă în două cromatide; acestea devin cromozomi independenți și se deplasează spre polii opuși ai celulelor.

(4) Telofaza II. Din cele două celule-fiice se formează *patru celule haploide cu 23 cromozomi monocromatidieni* care, prin maturare, se transformă în gameți fecundabili. *Gameții rezultați nu sunt identici*, fiecare având o altă combinație de gene datorită fenomenelor de *crossing-over* și segregare independentă a cromozomilor.

În meioză există cu certitudine un *sistem de supraveghere* (care semnalează erorile meiotice) și de *asigurare a calității proceselor* (desfășurării normale a meiozei).

Punctele de control și proteinele implicate sunt însă mai puțin definite la om, comparativ cu alte eucariote mai inferioare. În pahiten se verifică *fidelitatea împerecherii și sinapsei* cromozomilor omologi (decisive pentru corectitudinea recombinării și apoi a

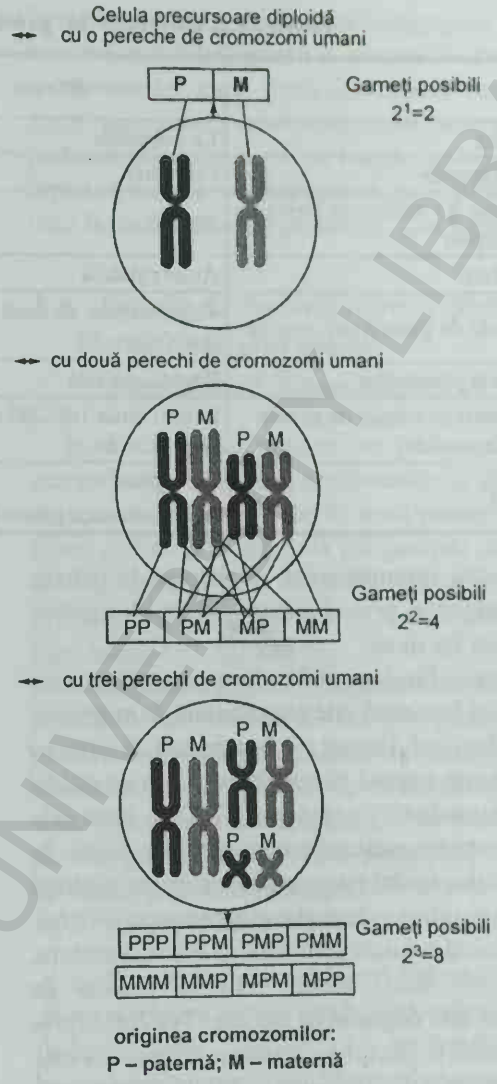


Figura 6.16. Recombinarea intercromozomială – sursă de variabilitate genetică

(adaptat după Stine, 1989)

segregării). Ulterior se evaluează dacă *recombinarea este completă* pentru a se declanșa dezasamblarea *complexului sinaptonemal* și segregarea, iar în metafază se verifică dacă *atașarea bivalenților la fus* este corectă.

Cert este că *identificarea proteinelor* și *mecanismelor moleculare* ce intervin în cele trei evenimente ale profazei I (împerecherea, sinapsa, recombinarea) precum și în segregare ar putea clarifica mecanismele nedisjuncției meiotice și, posibil, s-ar putea preveni consecințele ei majore.

1.2. Particularitățile gametogenezei la bărbat și la femeie

Meioza prezintă la cele două sexe o serie de particularități legate de cronologia și desfășurarea ei (tabelul 6.2). La bărbat, dintr-o spermatogonie se formează

BCU "LUCIAN BLAGA" CLUJ-NAPOCA
BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

Tabelul 6.2. Diferențe în gametogeneză la bărbat și la femeie

	Bărbat	Femeie
Debut	La pubertate	În viața embrionară
Desfășurare	Continuă	Discontinuă
Număr de mitoze în formarea gameților	30-500	20-30
Reglare	Autoreglabilă	Condiționată de factori externi
Număr de gameți per meioză	4 spermatide, de două feluri (cu X și cu Y)	1 ovul + 3 globule polare (numai cu X)
Durata procesului	Rapidă: 64 zile	Lentă: 10-50 de ani
Intensitate: număr de gameți în viața adultă	Intens: circa 100-200 milioane per ejaculare	Foarte puțin intensă: 1 ovul per ciclu menstrual
Erori	De copiere (risc de mutații genice)	De distribuție a materialului genetic (risc de anomalii cromozomice)

în final patru spermatozoizi, în timp ce la femeie, dintr-o ovogonie, prin eliminarea globulilor polari, rezultă doar un ovul.

Diferența fundamentală între gametogeneza masculină și feminină este reprezentată de *momentul în care debutează*. Recent s-a demonstrat că *intrarea în meioză* este reglată la mamifere și om de *acidul retinoic* și mediată de proteina STRA8; între cele două sexe startul meiozei este cronologic diferit. În ovarele fetale, acidul retinoic produs de mezonefros (rinichiul primitiv) induce expresia proteinei STRA8, care determină celulele germinale să înceapă meioza. În testiculul fetal, acidul retinoic produs de mezonefros este degradat de enzima CYP26B1 (produsă de celulele Sertoli) și intrarea în meioză este blocată până la pubertate; atunci, acidul retinoic este sintetizat din nou (de către celulele Sertoli) fără a mai fi degradat.

a) Gametogeneza masculină

Spermatogeneza începe la *pubertate* (sub acțiunea FSH, LH și a acidului retinoic) și *continuă* toată viața adultă (datorită celulelor stem spermatozoidale). Fiecare spermatocit primar va produce, prin meioza I, două spermatocite secundare haploide care, după ce parcurg meioza II, dau naștere la patru spermatide; ele se vor diferenția în spermatozoizi de două feluri: jumătate au un cromozom X, iar jumătate au un cromozom Y. Cromozomii X și Y conțin fiecare gene de sexualizare specifice fiecărui sex. Așa cum am văzut, în profaza meiozei I ei se unesc „*cap la cap*" (și nu „*margine la margine*", ca autozomii); această configurație împiedică schimbul de gene dintre X și Y și deci păstrarea unui singur tip de determinanți sexuali, fie masculini, pe Y, fie feminini pe X. Acest fenomen, important în evoluție, a permis realizarea gonocorismului (gonade distincte la indivizi diferiți).

Întregul proces de spermatogeneză durează aproximativ 64 de zile, indiferent de vârstă; deci meioza masculină este un proces *rapid*, iar bărbatul este totdeauna „tânăr" prin gameții săi.

Meioza masculină este un proces *intens*, 1 ml de spermă conținând, în mod normal, circa 70 de milioane de spermatozoizi. Ținând cont de faptul că numai un singur spermatozoid este fecundant, am putea aprecia că gametogeneza masculină este „neeconomică" și, prin aceasta, lipsită de sens biologic. În realitate, „natura nu face risipă" deoarece numărul enorm de spermatozoizi realizează o populație considerabilă, în care șansele de realizare a unui fenomen sunt teoretic egale cu cele de realizare a fenomenului contrar. Așadar șansele unui spermatozoid cu X de a fecunda un ovul cu X și a da un zigot XX sunt egale cu șansele unui spermatozoid cu Y de a se uni cu un ovul cu X și de a forma un ou XY. În felul acesta, *proporția sexelor la naștere este aproape 1:1*.

Studiile efectuate asupra timpului și ritmului desfășurării meiozei masculine au evidențiat că acest proces este *autoreglabil*, căci, o dată declanșat, el se autoîntreține *ritmic*, ca „o reacție în lanț", nefiind condiționat de factori externi. Meioza masculină este însă *sensibilă* la acțiunea factorilor nocivi de mediu (poziția intra-abdominală a testiculelor, în criptorhidie, temperatura ridicată, ischemia) care pot reduce eficiența spermatogenezei.

Desfășurarea ritmică și regulată a meiozei masculine asigură *o deplină siguranță a procesului de distribuție a cromozomilor*. Creșterea vârstei tatălui nu produce o creștere a frecvenței erorilor de distribuție și deci a anomaliilor cromozomiale. În schimb, meioza masculină *produce fără oprire copii celulare identice* (20-25 de cicluri de replicare pe an). Dacă apare o mutație genică în celulele sușă, aceasta este *copiată neîntrerupt*: la vârste tinere numărul de celule ce vor avea mutația este mic, dar la vârste mai înaintate el devine semnificativ, producând un veritabil *mozaic germinal*. De aceea, o dată cu creșterea vârstei, bărbații sănătoși au un risc crescut și recurent

de a avea copii cu afecțiuni monogenice autozomal dominante (neurofibromatoză, acondroplazie ș.a.) (vezi capitolul 7.C.3.1), deoarece *o mutație apărută este copiată neîntrerupt.*

b) Gametogeneza feminină

Spre deosebire de bărbat, la femeie ovogeneza începe *prenatal și este discontinuă.* În luna a II-a de viață intrauterină, *ovogoniile* încep să se dividă repetat și apoi se transformă în *ovocite primare*; după numeroase runde de mitoză se realizează (la 20 săptămâni de vârstă gestațională) o populație de circa 7 milioane ovocite. Prenatal și după naștere se produce însă o reducere (apoptotică) drastică a numărului de ovocite („*rezerva ovariană*" va fi de circa 300.000 de ovocite la pubertate și numai 1.000 de ovocite la 10 ani înainte de menopauză); dintre acestea doar 300-400 ovocite vor intra treptat în ovulație, după pubertate. Deci, spre deosebire de bărbat, la care spermatogoniile se produc continuu, în număr foarte mare, până la bătrânețe, *„capitalul" de ovocite al ovarului este limitat.*

Ovocitele primare au, de asemenea, câteva particularități ce le deosebesc de spermatocite: sunt celule mari, au un nucleu *excentric* și încep precoce meioza I (în luna a II-a), dar nu depășesc stadiul de pahiten, fiind blocate, în diploten, într-o „fază de așteptare" numită **dictioten** (prin intervenția unei proteine numite OMI, de la „*ovocyte meiosis inhibitors*"); ele rămân în această fază timp de 10-50 de ani, până la ovulație. Această perioadă lungă de „așteptare" predispune la erori de segregare în anafaza meiozei I. După pubertate, sub acțiunea FSH și LH hipofizar, câteva ovocite își încep *lunar* maturarea, dar de regulă numai unul singur (maximum două) termină meioza I, formând două celule haploide *inegale* (datorită poziției excentrice a nucleului): ovocitul II (care preia aproape toată citoplasma ovocitului I) și primul globul polar. Meioza II începe imediat, dar este *oprită din nou* în metafaza II și nu se reia decât dacă s-a produs fecundarea. Atunci are loc expulzia celui de-al doilea globul polar. Devine evident că meioza la femeie este *un proces discontinuu și condiționat de factori externi* (FSH și LH, ovulația, fecundarea). La femeie, prin meioză, dintr-un ovocit I rezultă *o singură celulă sexuală matură*, apță de fecundare (și două globule polare, care vor degenera). Toate ovocitele vor avea un cromozom X.

Ritmul lent al ovogenezei (un ovul pe lună) face ca gametogeneza feminină să fie *puțin intensă*: în cursul perioadei reproductive (de numai 30 ani, deoarece meioza feminină *se oprește definitiv* la menopauză) se maturează numai 300-400 ovocite. Din acest motiv, apar puține „erori de copiere" (se produc copii puține, dar impecabile). Totuși, ovogeneza nu este ferită de accidente: o dată cu creșterea vârstei reproductive, mai ales după 35 de ani, se produc mai frecvent *accidente de distribuție/segregare a cromozomilor*, rezultând gameți cu anomalii de număr ale cromozomilor care, după fecundare, vor produce zigoți anormali. Aceste erori sunt determinate de particularitățile meiozei la femeie și în special de faptul că meioza este discontinuă, necesită intervenția unor factori externi, iar ovocitele... *„au vârsta femeii"*.

1.3. Erorile de recombinare și distribuție a materialului genetic în meioză și consecințele lor

În desfășurarea meiozei se pot produce două categorii de erori, corespunzătoare celor două evenimente majore care au loc în acest proces: recombinarea genică și segregarea (disjuncția) anafazică a cromozomilor. Prima categorie este reprezentată de crossing-over-ul inegal (numit și *recombinare omologă nealelică*), iar cea de-a doua, de *nedisjuncția meiotică, pierderea unor cromozomi* sau *nesepararea* ovocitelor de ordinul II. Ele pot genera *oprirea evoluției celulelor germinale* și sterilitate sau *gameți anormali*, cu aneuploidii sau cu deleții/duplicații a unor segmente cromozomiale. De semnalat că *aneuploidia gametică* este cauza principală de avorturi spontane și anomalii congenitale la om, interesând circa 5% din toate sarcinile recunoscute clinic.

a) Erorile de recombinare Fenomenul normal de recombinare genică produs în profaza meiozei I (pahiten), prin *crossing-over*, presupune alinierea cromozomilor omologi, împerecherea secvențelor omoloage și un schimb *reciproc și egal* de material genetic. Uneori se poate produce accidental un ***crossing-over inegal***, o recombinare „ilegitimă", care are loc între secvențe omoloage de ADN (deseori repetitive), dar nealele (nu sunt situate în aceeași poziție în cromozomi) care s-au aliniat (împerecheat) incorect în zigoten (figura 6.17); după *crossing-over* rezultă cromozomi cu *duplicații* sau *deleții* ale unor segmente mici (ce conțin una sau mai multe gene).

Fenomenul de **recombinare omoloagă nealelică** (inegală sau ectopică) este considerat procesul fundamental al *evoluției unor gene prin duplicație* (de exemplu, evoluția genelor globinelor; vezi capitolul 3, figura 3.10), precum și mecanismul creșterii numărului de secvențe repetate în tandem, din structura ADN înalt repetitiv.

CO inegal are, evident, și consecințe patologice deoarece duplicația sau deleția unor mici regiuni cromozomice poate produce un fenotip anormal. Acest mecanism de producere a *„macroleziunilor din ADN"* a fost identificat relativ recent, prin analiză moleculară, în mai multe boli monogenice (de exemplu *boala Charcot-Marie-Tooth*, figura 6.17,

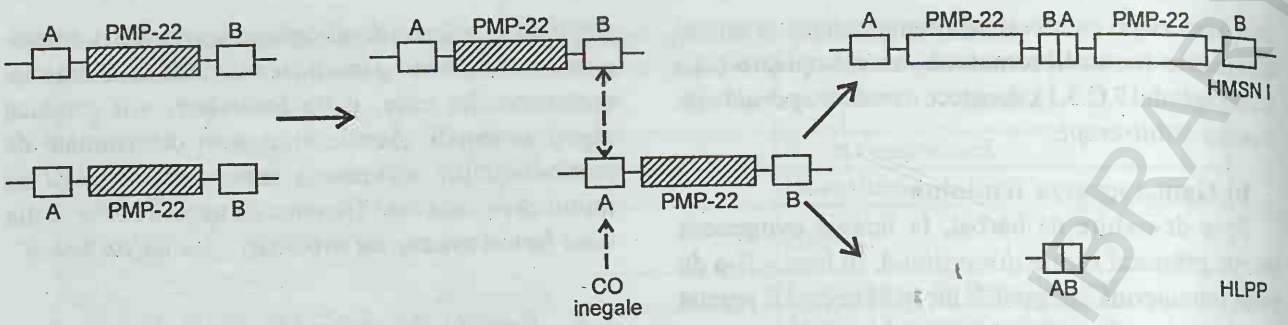


Figura 6.17. Duplicația și deleția unei gene prin *crossing-over* inegal

Datorită unor secvențe repetitive scurte, identice, dar nealele (A și B) ce flanchează gena *PMP22* ce codifică *mielina nervilor periferici* se produce o aliniere greșită a cromatidelor și apoi un *crossing-over* inegal care va determina duplicația genei (HMSN I – neuropatie motorie și senzorială tip I) și deleția ei (HLPP – neuropatie ereditară cu predispoziție la pareze presionale)

cea mai frecventă boală neurologică ereditară), precum și în multe sindroame cu microdeleție sau microduplicație (de exemplu, sindromul velo-cardio-facial prin microdeleția 22q11.2). Împreună ele alcătuiesc grupul de *boli genomice* (vezi capitolul 9.C.2).

b) Erorile de distribuție

În anafazele meiozelor I și II materialul genetic este împărțit egal și total celulelor-fiice. Acest proces poate suferi, ca și în mitoză, erori de distribuție (de segregare) care vor duce la formarea unor *gameți neechilibrați genetic*; după fecundarea lor vor rezulta *zigoți anormali*, cu aneuploidii. În funcție de evoluția acestor zigoți se pot produce avorturi spontane, nou-născuți morți sau nou-născuți vii plurimalformați. Mecanismele principale de apariție a acestor erori sunt: *nedisjuncția* (cromozomială, cromatidiană), *pierderea unor cromozomi* (ca urmare a migrării întârziate în anafază), *neseparareа ovocitelor de ordinul II* (celule rezultate după meioza II).

(1) Nedisjuncția este lipsa separării cromozomilor ce formează o pereche de omologi, în anafaza meiozei I (*nedisjuncție cromozomială*) sau a cromatidelor surori ale unui cromozom (*nedisjuncție cromatidiană*) în meioza II; datorită acestei erori, ambele „unități" (cromozomul sau cromatida) trec într-o celulă fiică și vor lipsi în cealaltă celulă. Prin nedisjuncție[41], în meioza I sau II rezultă gameți *disomici* și *nulisomici* care, după fecundarea cu un gamet normal, vor forma un zigot trisomic sau monozomic (vezi capitolul 7.C.2). Deși dezechilibrul cromozomial produs de cele două tipuri de nedisjuncții este de același tip, între nedisjuncția din meioza I și nedisjuncția din meioza II sunt totuși diferențe mai subtile (figura 6.18). Dacă eroarea are loc în meioza I, toți gameții vor fi anormali, iar gametul disomic, cu 24 de cromozomi, va avea ambii cromozomi (matern sau patern) ai perechii; dacă nedisjuncția are loc în meioza II, numai jumătate dintre gameți vor fi anormali, iar gametul disomic va avea ambele

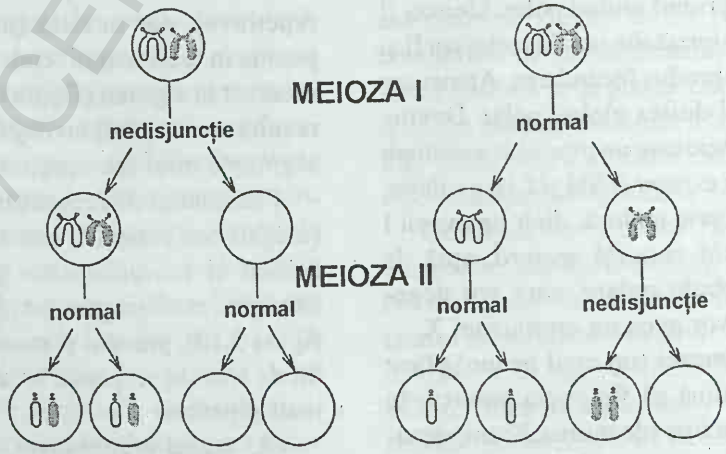


Figura 6.18. Consecințele nedisjuncției în meioza I și II

(după Nussbaum *et al.*, 2001)

41. Nedisjuncția poate fi *primară* atunci când se produce în gametocite normale sau *secundară* când are loc în gametocite trisomice (produse printr-o nedisjuncție primară în cursul multiplicării mitotice a ovogoniilor sau spermatogoniilor).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

copii (cromatide), fie ale cromozomului matern, fie ale celui patern (disomie uniparentală; vezi subcapitolul 7.C.1.4)[42]. Problema nedisjuncției va fi discutată pe larg în secțiunea 7.C.3.

(2) Întârzierea anafazică constă în pierderea unui cromozom în cursul anafazei meiozei I sau II. În consecință, apar *gameți nulisomici* (n–1) care, prin fecundare, vor forma *zigoți monosomici* (2n–1); majoritatea sunt incompatibili cu supraviețuirea (excepție 45, X).

(3) Nesepararea „ovocitelor" de ordin II este un eveniment prin care se formează *gameți diploizi*, care au întregul set de cromozomi (2n). Prin fecundare cu gameți normali apar *zigoți triploizi*, neviabili (3n = 69 cromozomi).

2. Fecundarea

Prin fecundare se înțelege unirea celor doi gameți, ovulul și spermatozoidul, și formarea zigotului, din care se va dezvolta un nou organism. În felul acesta, părinții transmit, prin gameți, „zestrea" lor ereditară viitorilor descendenți.

Fecundarea este un fenomen complex, cu anumite caracteristici; dintre acestea vom reține, pentru cadrul discuției noastre, faptul că, la om, fecundarea este *monospermică*: pătrunderea unui singur spermatozoid în ovul determină o serie de evenimente biochimice care împiedică intrarea altor spermatozoizi. Concomitent, aparatul mitotic al ovocitului (situat la periferie) este brusc activat și se finalizează meioza II, eliminându-se al doilea globul polar. Setul de cromozomi ce rămâne în ovocit formează *pronucleul feminin*. În citoplasma ovulului, spermatozoidul suferă o serie de modificări (coada și piesa intermediară, ce are câteva mitocondrii, sunt dezintegrate), iar nucleul său devine *pronucleul masculin*. Cei doi pronuclei se apropie unul de altul, cromozomii lor se replică sincron și, după ruperea membranelor nucleare, se fixează pe fibrele primului fus de diviziune; zigotul se divide și formează primele două celule-fiice diploide.

În cursul fecundării au loc mai multe evenimente genetice. În primul rând, prin fuziunea celor doi gameți haploizi (n = 23) *se reface numărul diploid de cromozomi*, caracteristic speciei umane (2n=46). Începând cu zigotul, toate celulele somatice vor avea cromozomii în perechi de omologi, identici ca morfologie și structură genetică, dar diferiți ca origine. În momentul fecundării, genele parentale din cromozomii gameților formează *o structură nouă*, total diferită de a părinților, unică și constantă; ea determină *individualitatea genetică* a organismului. Contribuția părinților la ereditatea copiilor nu este perfect egală deoarece ADN mitocondrial provine exclusiv de la mamă, prin mitocondriile din citoplasma ovulului.

În al doilea rând, în momentul fecundării *se stabilește sexul genetic* XX sau XY al viitorului organism, prin asortarea cromozomilor sexuali din gameți. Întrucât la mamifere și om sexul masculin este heterogametic, el va produce două tipuri de spermatozoizi cu X și cu Y, care, fecundând un ovul cu X, vor realiza sexul genetic XX și respectiv XY. Așa cum am arătat, numărul foarte mare de spermatozoizi lansat în cursul unui raport sexual fecundant asigură condițiile statistice care oferă celor două tipuri de spermatozoizi șanse egale de fecundare; de aceea, raportul sexelor la naștere este aproape 1:1.

> În realitate, studiile sexului genetic la fetuși au arătat o ușoară predominanță a sexului masculin (120 de fetuși masculini la 100 feminini, deci 54,5%); o explicație posibilă ar fi mobilitatea mai mare a spermatozoizilor cu Y, care ajung mai rapid la „țintă". Diferențele se mai reduc la naștere (51,5%) și se pare că se anulează la pubertate, pentru ca, în a treia decadă de viață, raportul să fie favorabil sexului feminin. Această „dinamică" nu este clar explicată; o ipoteză susține că sexul feminin este „mai rezistent" la agresiunile externe deoarece are un cromozom X în plus, care nu ar fi total inactivat (conform ipotezei Lyon) (vezi capitolele 2.D.2.2 și 4.B.4.a).

În cursul fecundării, se pot produce o serie de devieri de la mecanismul sau rezultatul procesului normal de fecundare. Există astfel posibilitatea rară a unei **duble fecundări** atunci când ovarul eliberează, în momentul ovulației, două ovule. Prin fecundarea lor individuală se vor forma doi zigoți; ei pot evolua separat, independent unul de altul, formând *gemenii dizigoți*, sau se pot uni într-o singură masă embrionară ce va produce un singur individ cu două componente genetice distincte ca origine („*doi indivizi într-unul singur*"), numit **himeră** (după monstrul din mitologia greacă care avea cap de leu, corp de capră și coadă de balaur). În ultimul caz, dacă zigoții vor avea același sex genetic, se realizează o sexualizare normală și numai studiul unor caractere ereditare normale (grupe sangvine, serice etc.) va evidenția existența unei duble populații celulare[43]. Dacă zigoții care s-au unit aveau sexe genetice diferite, se realizează o constituție

42. În această situație, când ne referim la cromozomi avem în vedere centromerele deoarece o parte din materialul lor s-a schimbat prin CO, deci fiecare cromozom are și segmente materne și paterne.
43. Himera se deosebește de *mozaic* deoarece populațiile (clonele) celulare diferite au origini diferite; în mozaicuri, clonele celulare anormale au origine comună cu cele normale, provin din același zigot.

genetică XX/XY care va produce o tulburare de sexualizare, numită *hermafroditism adevărat*.

O altă anomalie de fecundare este **dispermia**, situația foarte rară în care un ovul este fecundat de doi spermatozoizi. Rezultă un zigot triploid (3n). Același rezultat poate fi obținut atunci când unul dintre gameți este diploid (*diginie* sau *diandrie*) (vezi capitolul 7.C.1.2). Evoluția unui *zigot triploid* va depinde de originea setului haploid suplimentar: dacă este de proveniență maternă (*diginie*), atunci dezvoltarea embrionară este sever întârziată, placenta este mică și fibrotică, iar embrionul este avortat precoce; dacă este de origine paternă (*diandrie*), se va forma o placentă anormală, mare și polichistică, cu un embrion slab dezvoltat (*molă hidatiformă parțială*).

Vom menționa, în sfârșit, situația în care un spermatozoid 23, X fecundează un ovul fără nucleu și setul de cromozomi ai spermatozoidului se dublează formând un zigot 46,XX, în care toți cromozomii sunt de origine paternă și toate genele alele vor fi homozigote; se produce o dezvoltare anormală a trofoblastului și dezorganizarea embrionului, numită *molă hidatiformă completă*. Există și situația inversă, în care celule 46,XX conțin numai cromozomi materni; ele proliferează și produc un *teratom ovarian* (alcătuit din celule embrionare, dar nu și din țesut placentar). Din cele două situații prezentate mai sus rezultă că dezvoltarea fetală normală necesită ambele contribuții genetice, maternă și paternă.

În încheiere, notăm că fecundarea se poate realiza și *in vitro* (FIV sau IVS) după parcurgerea unor etape delicate: recoltarea de ovule (precedată de hiperstimulare ovariană), fecundarea (directă a gameților sau injecția intracitoplasmatică a unui spermatozoid) și realizarea primelor diviziuni ale zigotului *in vitro* (2-5 zile), selecția embrionilor (în stadiul de blastocist)[44] și transferul a 1-3 embrioni în uterul „pregătit" pentru sarcină. Prima naștere cu succes a unui „*copil conceput în eprubetă*" s-a realizat în 1978; metoda a devenit ulterior larg folosită la cuplurile cu infertilitate, iar dr. Robert Edwards care a dezvoltat această tehnică a primit în 2010 Premiul Nobel.

D. Ereditatea monogenică

1. Legile lui Mendel

Transmiterea caracterelor ereditare de la părinți la copii a fost remarcată din cele mai vechi timpuri însă explicațiile date similitudinii familiale și încercările de a stabili legile eredității au cunoscut numeroase eșecuri. Ele erau generate de ipoteza greșită a „*amestecării caracterelor ereditare*" care considera că descendenții prezintă un amestec al caracterelor parentale; ele își pierd identitatea și nu se vor mai regăsi ca atare în generațiile următoare.

Pe baza unor cercetări experimentale, Gregor Mendel a demonstrat (1865) că la urmași nu se produce nici un amestec al caracterelor parentale; unele caractere nu se exprimă în prima generație filială, dar pot apărea neschimbate ulterior. Pentru a explica aceste fenomene, Mendel a presupus că fiecare caracter este determinat de *o pereche de factori ereditari* (numiți mai târziu „gene") care, în momentul formării gameților, se separă, *segregă*, distribuindu-se la întâmplare în celulele sexuale. Mendel a observat că transmiterea caracterelor ereditare este un proces statistic, ce poate fi descris în termeni de probabilitate, și a formulat legile care guvernează acest proces: *legea segregării* și *legea asortării independente* – care stau la baza geneticii ca știință.

Cercetările și rezultatele obținute de Mendel au fost ignorate de către contemporanii săi „nepregătiți" pentru a le înțelege. În anul 1900, principiile stabilite de Mendel au fost *redescoperite experimental* simultan în trei laboratoare diferite, demonstrându-se că legile eredității ar fi fost descoperite, la un anumit nivel al dezvoltării cunoștințelor, chiar și... în absența lui Mendel, deoarece *legile eredității sunt legi obiective*. Doi ani mai târziu, Walter Sutton, pornind de la ipoteza (plauzibilă) că materialul ereditar se găsește în cromozomi, stabilește o corelație strânsă între comportamentul cromozomilor în meioză și principiile enunțate de Mendel, formulând „**teoria cromozomială a eredității**". În același an (1902), un medic englez, sir Archibald Garrod, a raportat primul exemplu de ereditate mendeliană la om – *alcaptonuria*, o anomalie biochimică congenitală transmisă ereditar, recesiv. Ulterior, el a studiat și alte boli ereditare (albinismul, cistinuria și pentozuria), veritabile „*erori înnăscute de metabolism*", și a pus astfel bazele geneticii medicale.

Datele acumulate de genetica secolului XX au demonstrat *universalitatea* legilor lui Mendel.

44. Selecția embrionilor se face de obicei pe criterii morfologice, dar se folosesc și alte metode, inclusiv diagnosticul preimplantator (vezi capitolul 19), pentru a „verifica" calitatea produsului de concepție realizat *in vitro*. Menționăm totuși că FIV nu este lipsită de complicații, inclusiv o ușoară creștere a frecvenței fetușilor cu anomalii congenitale, iar probabilitatea de reușită este de circa 30%.

Numeroase caractere umane normale sau anormale, determinate monogenic, se transmit în concordanță cu aceste legi. Dacă Mendel ar fi trăit în epoca noastră, i-ar fi fost probabil mult mai ușor să descopere legile geneticii studiind ereditatea familiilor umane.

Dezvoltarea geneticii moleculare a modificat și dezvoltat în mare măsură „mendelismul clasic" mai ales prin înțelegerea modului de exprimare a genei și a interacțiunilor complexe dintre gene.

1.1. Prima lege a lui Mendel: legea segregării

Prima lege a lui Mendel sau legea segregării[45] a fost stabilită și poate fi demonstrată prin urmărirea rezultatelor încrucișărilor între indivizi care diferă printr-un singur caracter (*monohibridare*) sau – mai exact – printr-un cuplu de caractere alternante sau contrastante.

Vom analiza un exemplu concret. După capacitatea de a simți gustul amar al feniltiocarbamidei (PTC) sau al feniltioureei, circa 70% din populație este alcătuită din „*gustători*" și 30% din „*negustători*". Din căsătoria unui gustător cu un negustător (generația P sau parentală) rezultă în F1 (prima generație filială) numai descendenți gustători (100%); încrucișarea lor va produce în F2 atât gustători, cât și negustători. Caracterul parental gustător care se manifestă în F1 și F2 este **dominant**, iar cel negustător, care apare numai în F2, se numește **recesiv**. Cumulând mai multe observații familiale și calculând proporția celor două fenotipuri, se obține în F2 un rezultat egal sau apropiat de 3:1.

Persoanele negustătoare din F2, prin încrucișare cu indivizi asemănători lor, vor da numai descendenți negustători. În schimb, din încrucișarea gustătorilor din F2 cu negustători[46] rezultă, în circa 1/3 din cazuri, numai gustători, iar în restul de 2/3 apar în proporții egale gustători și negustători; acest lucru ne arată că deși fenotipic gustătorii din F2 sunt identici, genotipic ei sunt diferiți. Ținând cont de această diferență și de raporturile procentuale, rezultă că indivizii din F2 aparțin fenotipic la două categorii, în proporție de 3:1, iar genotipic ei alcătuiesc trei grupe, în raportul de 1:2:1.

Pe baza acestui exemplu, se poate realiza un model general valabil al transmiterii caracterelor în monohibridări. El va fi interpretat în spiritul gândirii mendeliene, folosind însă noțiunile și cunoștințele acumulate ulterior de genetica clasică și în special cele despre cromozomi și dinamica lor în meioză.

Mendel a presupus că orice individ primește, prin gameți, material genetic de la *ambii părinți*. De aceea, fiecare caracter este determinat de o pereche de *„factori ereditari"* (termenul îi aparține lui Mendel) sau *alele* (ce ocupă același locus pe cromozomii omologi). Organismele din generația parentală (P) sunt *„pure"* din punct de vedere genetic, au alele identice, sunt homozigote: *A/A* și *a/a*. În anafaza meiozei I *genele alele segregă* și gameții (haploizi) conțin un singur „factor ereditar" sau alelă: (*A*) și (*a*); deci homozigoții sunt homogametici. Prin fecundarea acestor gameți rezultă un zigot (diploid) în care factorii ereditari materni și paterni *se asociază* alcătuind genotipul *A/a* al tuturor descendenților hibrizi din F_1. Ambii părinți contribuie *în mod egal* la ereditatea copiilor (tabelul 6.3).

Descendenții din F_1 (rezultați din încrucișarea organismelor parentale *homozigote* pentru două alele diferite ale aceluiași locus autozomal) au *un genotip identic* (sunt heterozigoți A/a) și sunt identici (*„uniformi"*) fenotipic; nu este important care dintre părinții homozigoți este tată sau mamă[47]. Aceasta este o regulă generală, denumită *„principiul uniformității și reciprocității"* hibrizilor din F_1 (după unii autori este „prima" lege a lui Mendel).

Să analizăm acum încrucișările dintre indivizii din generația F_1. În F_2 se obțin fenotipic două tipuri de urmași: unii dintre ei se aseamănă cu fenotipul dominant din P și F_1, iar alții cu fenotipul recesiv din P. Proporția lor este de 3 dominanți la 1 recesiv. Se observă că, în F_2, alături de caracterul dominant reapare caracterul parental recesiv, care nu s-a exprimat în prima generație filială, deși alela corespunzătoare (*a*) era prezentă (*A/a*). Rezultă că factorii ereditari sau genele care determină caracterul recesiv *își mențin neschimbată identitatea*, chiar dacă nu se manifestă fenotipic în F_1. Ele nu se „contaminează", nu „se amestecă" (așa cum se credea înainte de Mendel), rămân neschimbate, constante și riguros „pure". Alela recesivă devine manifestă în momentul în care (în F_2) se realizează starea homozigotă (*a/a*). „Un caracter recesiv circulă de-a lungul generațiilor ca un râu subteran, care reapare din timp în timp la suprafață, atunci când se produce confluența a două dintre brațele sale" (Ph. Sentis).

Prin studiul descendenților F_3 (sau prin retro-încrucișare $F_2 \times P_{recesiv}$) s-a demonstrat că în F_2 au rezultat în realitate trei tipuri de descendenți: ¼ seamănă cu părintele dominant, ½ sunt hibrizi ca și indivizii din F_1 și ¼ erau puri și asemănători părintelui recesiv. Acest raport genotipic 1:2:1 în F_2 indică faptul că jumătate din gameții unei persoane F_1 poartă alela dominantă, iar cealaltă jumătate – pe cea recesivă.

45. Se mai numește legea disjuncției caracterelor parentale sau legea purității gameților.
46. Negustătorul este asimilat tipului parental și atunci încrucișarea F_2 (sau F_1) x P se numește retro-încrucișare.
47. Acest fenomen, numit *„reciprocitate"* și se aplică numai genelor situate pe autozomi, nu și celor situate pe cromozomii sexuali.

Tabelul 6.3. Monohibridarea şi legea I a lui Mendel

Generaţie	Fenotipuri	Genotipuri	Observaţii
P	A × a	*A/A* × *a/a*	homozigoţi
		(A) *(a)*	gameţi
F_1	A	*A/a*	heterozigoţi
	(100%)		
Încrucişare indivizi F_1	A × A	*A/a* × *A/a*	heterozigoţi
		(A) şi (a) *(A) şi (a)*	gameţi
F_2	A şi a	*A/A* *A/a* *a/a*	
	(75%) (25%)	(25% 50%) 25%	
Retroîncrucişare F_1 × $P_{(recesiv)}$	$A_{(F1)}$ × a	*A/a* × *a/a*	gameţi
		(A) şi (a) *(a)*	
	A şi a	*A/a* *a/a*	
	(50%) (50%)		
Retroîncrucişare F_2 × $P_{(recesiv)}$	(1/3) $A_{(F2)}$ × a	*A/A* × *a/a*	gameţi
		(a)	
	A	*A/a*	
	(100%)		
	(2/3) $A_{(F2)}$ × a	*A/a* × *a/a*	gameţi
		(A) şi (a) *(a)*	
	A şi a	*A/a* *a/a*	
	(50%) (50%)		

Această concluzie a fost capitală pentru Mendel, căci ea i-a permis să înţeleagă mecanismul transmiterii genetice şi să formuleze **legea segregării**:

- orice individ primeşte, *în mod egal*, material genetic (gene) de la ambii părinţi;
- alelele parentale *se separă (segregă)* atunci când acel individ produce la rândul său gameţi;
- gameţii vor fi „*puri genetic*" (au o singură alelă din perechea de alele);
- prin combinarea *întâmplătoare* a gameţilor în F_2, se produce o separare, o disjuncţie, a caracterelor parentale, în proporţia de 3 dominanţi la 1 recesiv.

Legea segregării se explică astăzi perfect prin dinamica cromozomilor omologi în meioza primară (tabelul 6.3): ei se separă şi merg în celule distincte. Heterozigoţii (*A/a*) din F_1 produc două tipuri de gameţi (*A*) şi (*a*). Fiecare alelă din genotipul *A/a* are *o probabilitate egală* de a se transmite şi de a se găsi în gameţi, indiferent dacă este dominantă sau recesivă. Cele două tipuri de gameţi se produc în cantităţi statistic egale. Fiecare gamet are, de asemenea, o probabilitate egală de a se combina (fecunda) cu ceilalţi. Prin întâlnirea lor întâmplătoare pot rezulta în F_2 trei tipuri de indivizi cu genotipurile A/A, A/a, a/a în proporţie de 1:2:1. În funcţie de raporturile de dominanţă/recesivitate dintre gene vor rezulta proporţiile fenotipice de 3 dominanţi: 1 recesiv[48].

Trebuie să precizăm că există situaţii în care cele două alele ale heterozigoţilor sunt dominante şi această variantă de transmitere este numită **codominanţă**. Exemplele clasice sunt ereditatea grupelor sangvine M şi N sau A şi B, situaţii în care raportul de segregare după încrucişarea a doi heterozigoţi (MN x MN sau AB x AB) este 1:2:1.

Menţionăm, în finalul acestei discuţii, că acţiunea genei este *independentă de originea sa* maternă sau paternă; când se formează un zigot, genele „*par a uita*" originea lor parentală.

1.2. A doua lege a lui Mendel: legea asortării independente

A doua lege a lui Mendel sau **legea asortării independente**[49] poate fi demonstrată prin încrucişări între organisme ce se deosebesc prin două caractere (*dihibridări*) sau mai multe cupluri de caractere. Ele *se transmit independent* unul de altul: ereditatea primului caracter nu influenţează ereditatea celui de-al doilea. Explicaţia acestui fenomen rezidă în faptul că genele ce determină aceste caractere sunt *neînlănţuite*, situate pe cromozomi omologi diferiţi şi independente una faţă de alta; ele *se pot combina liber* între ele, formând genotipuri şi fenotipuri noi.

De exemplu, în încrucişarea unei persoane „gustător şi cu grupa sangvină A" cu alta „negustător şi cu grupă sangvină 0" va produce în generaţia F_1 *numai* indivizi „gustători, cu grupă sangvină A" (caractere dominante) (tabelul 6.4). Din încrucişarea lor rezultă în F_2 patru

48. Acest raport de segregare (3:1) se produce numai când numărul celulelor germinale este foarte mare (aşa cum se întâmplă în spermatogeneză), ce permite acţiunea legilor probabilităţii.
49. Se mai numeşte şi legea liberei combinaţii a factorilor ereditari sau „legea segregării independente a perechilor de caractere".

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 6.4. Dihibridarea și legea a II-a a lui Mendel

GENERAȚIE				
P	fenotip:	GUSTĂTOR;	GRUPĂ SANGVINĂ A ×	negustător; grupă sangvină 0
	genotip:	*G/G ;*	*A/A*	*g/g; o/o*
	gameți:	*(G;A)*	×	*(g;o)*
F_{1J}		GUSTĂTORI; GRUPĂ SANGUINĂ A (100%)		

$F_1 \times F_1$ fenotip: GUSTĂTOR ; GRUPĂ SANGUINĂ A × GUSTĂTOR ; GRUPĂ SANGUINĂ 0

genotip: *G/g ; A/o* *G/g ; A/o*

Combinații fenotipice	gameți	G ; A	G ; o	g ; A	g ; o
	G ; A	*G/G ; A/A*	*G/G ; A/o*	*G/g ; A/A*	*G/g ; A/o*
	G ; o	*G/G ; A/o*	*G/G ; o/o*	*G/g ; A/o*	*G/g ; o/o*
	g ; A	*G/g ; A/A*	*G/g ; A/o*	*g/g ; A/A*	*g/g ; A/o*
	g ; o	*G/g ; A/o*	*G/g ; o/o*	*g/g ; A/o*	*g/g ; o/o*

F_2 Combinații parentale → Combinații noi

GUSTĂTORI ;	GRUPĂ SANGVINĂ A	9
GUSTĂTORI ;	grupă sangvină 0	3
negustători ;	GRUPĂ SANGVINĂ A	3
negustători ;	grupă sangvină 0	1

	GUSTĂTORI	Negustători	
GRUPĂ SANGVINĂ A	9	3	12
grupă sangvină 0	3	1	4
	12	4	

tipuri de descendenți: gustători – grupa A; gustători – grupa 0; negustători – grupa A; negustători – grupa 0, în proporție de 9:3:3:1. Prima remarcă pe care o putem face în acest caz se referă la reapariția în F_2 a tipului parental recesiv: negustător – grupă 0. Se remarcă apoi că în F_2 apar, alături de fenotipurile parentale, două *fenotipuri noi* ce rezultă prin *recombinarea* caracterelor din generația P. Explicația acestor fenomene este astăzi simplă, întrucât cunoaștem structura și funcția genelor, precum și dinamica cromozomilor în meioză (anafaza I).

Organismele parentale diferă prin două caractere distincte, determinate de gene situate pe cromozomi diferiți (*neînlănțuite*). Aceste organisme sunt *homozigote*, întrucât genele alele sunt identice: (*G/G; A/A*) și (*g/g* și *0/0*). Ele vor forma fiecare un singur tip de gameți (*G;A*) și (*g;o*) care – după fecundare – vor da prima generație filială (F_1) de indivizi „uniformi" fenotipic și dublu heterozigoți (*G/g; A/o*); caracterul „gustător – grup A" este dominant. Prin încrucișarea acestor persoane F_1 între ele rezultă patru fenotipuri diferite, deoarece în momentul în care se formează gameții, genele ce alcătuiesc cele două perechi de alele (*G/g*) și (*A/o*), segregă (se separă) și se asortează independent una de alta, întocmai ca și cromozomii omologi în anafaza meiozei primare. Fiecare persoană F_1 formează patru tipuri de gameți: *GA; Go; gA; go* – care, prin fecundare *întâmplătoare*, vor da 16 genotipuri (de 9 feluri) (tabelul 6.4). Deoarece genele *G* și *A* sunt dominante față de *g* și *o*, rezultă numai patru categorii fenotipice parentale, în proporție de 9:3:3:1; două sunt identice cu fenotipurile parentale, celelalte două sunt noi și rezultă prin recombinarea lor. Apariția acestor combinații noi pledează pentru faptul că asortarea genelor în gameți este un proces în întregime întâmplător. Remarcăm faptul că fiecare caracter, luat separat, segregă independent de celălalt, realizând raportul specific pentru monohibridare de 3:1 (12 gustători : 4 negustători și 12 grupa A : 4 grupa 0).

Legea a doua a lui Mendel sau **legea asortării independente** (sau a liberei combinații a factorilor ereditari) postulează că:

- genele ce determină un caracter *segregă independent* de genele ce determină alt caracter;
- genele ce alcătuiesc diferite perechi de alele (A/a; B/b ș.a.m.d.) *se asortează (se combină) independent* una de alta, atunci când se formează gameți;
- în cazul a două perechi de caractere, raportul de segregare fenotipică în F_2 este 9:3:3:1.

La baza acestei legi stă fenomenul de asortare independentă a cromozomilor din perechile de omologi,

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ce are loc în cursul anafazei meiozei primare (recombinare cromozomială).

2. Transmiterea caracterelor monogenice

2.1. Date generale

Caracterele monogenice sunt cele mai simple caractere genetice a căror prezență sau absență depinde de alelele, normale sau mutante, ale *unui singur locus*, situat pe autozomi sau pe cromozomul X. Desigur, manifestarea caracterului poate depinde și de alți factori, genetici sau de mediu, dar genele respective sunt *necesare și suficiente* pentru exprimarea caracterului. Ele au *efecte importante* și se conformează în mod obișnuit principiului „o genă → o proteină → un caracter", deși, după cum știm deja, mutații diferite în aceeași genă pot produce fenotipuri (boli) diferite sau, invers, mutații în gene diferite se pot manifesta fenotipic identic (vezi heterogenitatea genetică, capitolul 4.A). Aceste caractere monogenice se moștenesc, de obicei, într-un mod simplu, identic sau similar cu cel descris de către Mendel; de aceea, ele se numesc și **caractere mendeliene**.

Se cunosc peste 20.000 de caractere mendeliene, listate în versiunea online (*OMIM*) a catalogului de referință a lui Victor McKusick „*Mendelian Inheritance in Man*" (ed. 12, 1998 – ultima ediție tipărită), indispensabilă tuturor medicilor confruntați cu patologia genetică (caseta 6.3).

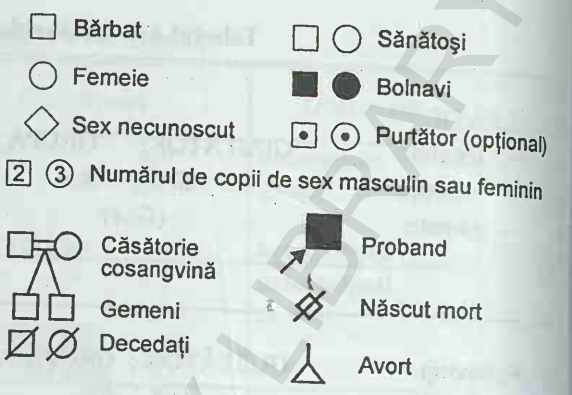


Figura 6.19. Simbolurile principale folosite într-un arbore genealogic

Bolile monogenice sunt caracterizate prin *modul lor de transmitere în familie*, stabilit în urma unei anamneze (istoric) familiale și reprezentat grafic (cu ajutorul unor simboluri standard) sub forma unui arbore genealogic (în engleză *pedigree*[50]) (figura 6.19).

Asupra acestei acțiuni, importantă în diagnosticul bolilor genetice, vom reveni cu detalii mai târziu (vezi capitolul 10.A), dar acum vom introduce câțiva termeni de bază, pentru a facilita discuțiile/exemplele privind transmiterea genealogică. Persoana afectată, bărbat (■) sau femeie (●) de la care începe recenzarea unei familii cu o boală genetică se numește **proband** (*caz index* sau *propositus/proposita*, în funcție de sex), iar persoana care consultă medicul (fiind o rudă sănătoasă sau afectată cu probandul) se numește **consultand**. Relațiile intrafamiliale și gradele de rudenie sunt redate în figura 6.20. Poziția unei persoane în arbore este indicată prin *numere romane* pentru generație și *numere arabe* pentru locul unui individ într-o generație.

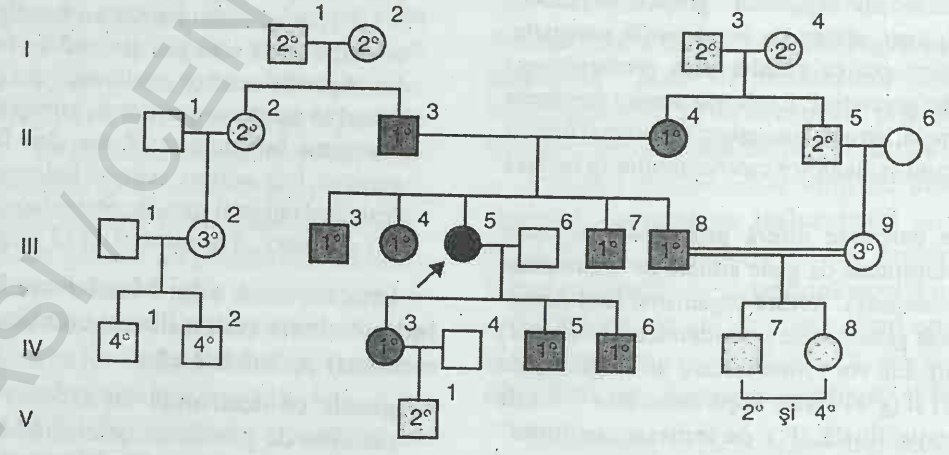


Figura 6.20. Arbore genealogic ipotetic în care sunt folosite simbolurile principale și se precizează gradul de rudenie între diferite persoane din familie

Probandul III-5, indicat printr-o săgeată, are rude de gradul de gradul întâi (1°)(părinții, frații- surorile sale – *fratria* – și descendenții săi), de gradul doi (2°) (bunici, unchi-mătușe, nepoți), de gradul trei (3°) (verii primari) și de gradul patru (4°) (veri secundari)

50. „Pedigree" derivă din expresia franceză *„pied de grue"* (picior de cocor) care exprimă aspectul ramificat al diagramei.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 6.3

OMIM

Mendelian Inheritance in Man *(MIM) este o bază de date care cataloghează toate bolilor cu o componentă genetică cunoscută și transmitere monogenică/mendeliană și stabilește legături cu genele relevante din genomul uman, furnizând informații și referințe despre toate acestea. MIM a fost elaborat în 1966 sub conducerea profesorului Victor McKusick de la Universitatea Johns Hopkins din Baltimore și se află în prezent la ediția a 12-a (1998). Versiunea online (disponibilă din 1985) este numită OMIM și poate fi accesată*[51] *la adresa de web: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/OMIM fiind permanent actualizată. La 22 noiembrie 2010, OMIM conținea 20262 de intrări, clasificate astfel:*

Simbo/Tip de intrare	*Autozo-male*	*Legate de X*	*Legate de Y*	*Mitocon-driale*	*Total*
** Gene cu secvență cunoscută*	*12.538*	*616*	*48*	*35*	*13.237*
+ Gene cu secvență și fenotip cunoscute	*344*	*19*	*0*	*2*	*365*
# Fenotipuri cu baze moleculare cunoscute și loci multipli	*2.642*	*233*	*4*	*28*	*2.907*
% Fenotipuri mendeliene sau loci, baze moleculare necunoscute	*1.636*	*133*	*5*	*0*	*1.774*
Altele, în special fenotipuri cu bază mendeliană posibilă	*1.847*	*130*	*2*	*0*	*1.979*
Total	*19.007*	*1.131*	*59*	*65*	*20.262*

Fiecare intrare are un număr unic din șase cifre. Prima cifră este importantă deoarece corespunde modului de transmitere a genei asociate: 1 – fenotipuri sau loci cu transmitere autozomal dominantă (desemnate înainte de 15 mai 1994); 2 – fenotipuri sau loci cu transmitere autozomal recesivă (stabilite înainte de 1994); 3 – fenotipuri sau loci cu transmitere legată de X; 4 – boli fenotipuri sau loci cu transmitere legată de Y; 5 – fenotipuri sau loci mitocondriale; 6 – fenotipuri sau loci cu transmitere autozomală (desemnate după 15 mai 1994). După cum se observă, după 1994 s-a renunțat la clasificarea genelor autozomale în dominante sau recesive deoarece unele gene pot avea mutații diferite cu transmiteri diferite[52]*. Variantele alelice ale unui locus sunt desemnate prin numere zecimale alcătuite din 4 cifre care urmează după codul de șase cifre. De exemplu, variantele alelice (mutațiile) genei pentru factorul IX al coagulării sunt desemnate prin 306900.0001 până la 306900.0101.*

OMIM prezintă de asemenea informații despre localizarea citogenetică a genelor morbide (OMIM Morbid Map), cartografierea organizată pe cromozomi a peste 12.600 loci (Human Gene Map), legături cu alte baze de date: specifice unui locus (de exemplu, cystic fibrosis mutation databases), fenotipuri și resurse clinice (de exemplu, GeneTest), baze de date ale NCBI (Genes and diseases; Entrez Gene; Map viewer etc.).

Modelul de transmitere ereditară a unui caracter monogenic în familie se definește prin două criterii:

- *localizarea* genei pe un autozom (caracter autozomal) sau pe cromozomii sexuali, X sau Y (caracter legat de X sau de Y);
- *fenotipul* dominant sau recesiv determinat de alele.

Astfel, există cinci modele de bază pentru transmiterea monogenică: autozomal dominant (AD), autozomal recesiv (AR), legată de X dominantă (XD), legată de X recesivă (XR), și legată de Y. Anamneza familială poate indica și alte modele de transmitere, nemendeliene (de exemplu, transmiterea maternală în bolile mitocondriale), dar la acestea ne vom referi distinct, ulterior.

Înainte de a descrie caracteristicile modelelor de transmitere monogenică sunt utile câteva considerații.

(1) Distincția dintre ereditatea autozomală și cea legată de X sau Y este evidentă, dar trebuie subliniat

51. Mai simplu: intrați pe *Google* și tastați în caseta de căutare: **OMIM**.
52. OMIM evidențiază un fenomen considerat până acum caracteristic speciei umane prin comparație cu alte specii: afecțiunile dominante sunt aproape de două ori mai numeroase decât cele recesive. Mai multe explicații sunt posibile: bolile umane sunt mai atent identificate și evaluate sau scăderea considerabilă a consangvinității. Probabil că fenomenul este valabil și la alte specii, dar nu a fost încă pus în evidență.

BCU CLUJ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

că bărbaţii XY au un singur cromozom X şi deci nu sunt niciodată homozigoţi sau heterozigoţi pentru genele localizate pe cromozomii sexuali, ci numai *hemizigoţi*. De asemenea, între genele situate pe cei doi X, la femeile XX, şi genele de pe o pereche de autozomi apar diferenţe, deoarece ambele alele autozomale sunt *active* (exceptând fenomenul de amprentare, la care ne vom referi mai târziu), dar genele de pe X, deşi se găsesc în „doză dublă", în marea lor majoritate sunt exprimate *numai* de pe unul dintre cei doi cromozomi X, celălalt fiind inactivat.

(2) Deşi există caractere determinate de gene/loci situate pe Y ele sunt, foarte probabil, neesenţiale pentru sănătate, deoarece femeile XX sunt perfect normale; aceste gene sunt implicate, în marea lor majoritate[53], numai în funcţiile sexuale, specific masculine, iar mutaţiile lor afectează numai aceste funcţii. Deci, foarte probabil (exceptând bolile corelate cu funcţia sexuală masculină), la om nu există alte boli legate de Y.

(3) Termenii de dominant şi recesiv definesc *proprietăţi ale caracterelor şi nu ale genelor*; ei se referă mai ales la fenotipul clinic, deşi descriptiv, sintetic, se folosesc termenii de alelă dominantă sau recesivă[54]. Clasic, *distincţia dintre dominant şi recesiv se realizează la heterozigoţi*: caracterele dominante se manifestă la heterozigoţi, iar cele recesive nu se manifestă la heterozigoţi, ci numai la homozigoţi. Evident, la bărbaţii hemizigoţi pentru loci de pe X sau Y nu se pune problema de dominant sau recesiv. Diferenţa dintre ereditatea dominantă şi recesivă nu este absolută, ci relativă (arbitrară) deoarece, în multe boli recesive, heterozigoţii au manifestări ale ambelor gene la nivel molecular/biochimic, celular şi uneori (în anumite condiţii) şi la nivel clinic. Să ne reamintim că *sicklemia* (vezi capitolul 4.B.1) este o afecţiune recesivă deoarece numai homozigoţii *(a/a)* manifestă obişnuit boala; heterozigoţii *(N/a)* prezintă însă *trăsătura sicklemică* deoarece produc atât HbA, cât şi HbS, iar în anumite condiţii (scăderea concentraţiei de oxigen) pot manifesta şi semne clinice. Mai mult, mutaţii diferite în aceeaşi genă autozomală (de exemplu, gena pentru hormonul de creştere) se pot transmite ereditar diferit, unele dominant, altele recesiv. De aceea, în catalogul OMIM, după anul 1994, caracterele autozomale au încetat să fie clasificate în dominante şi recesive.

În aceste condiţii, se pune firesc întrebarea: *cum vom diferenţia caracterele şi alelele dominante*? Distincţia este relativ simplă. Heterozigoţii cu o alelă normală şi alta mutantă vor avea doar jumătate din produsul normal al genei; dacă această jumătate este suficientă pentru realizarea funcţiilor genei, atunci alela mutantă este numită recesivă. Dacă acest lucru nu se întâmplă şi o alelă mutantă produce boala, chiar dacă există o alelă normală, atunci alela mutantă este dominantă.

(4) Clasic, orice fenotip exprimat la heterozigoţi este definit ca dominant; această definiţie este prea rigidă deoarece, în multe boli dominante, homozigoţii (deşi foarte rari) sunt mai sever afectaţi decât heterozigoţii; pentru aceste cazuri, în care heterozigoţii au un fenotip intermediar între homozigoţii afectaţi şi cei normali, s-ar putea folosi termenii de *dominanţă incompletă* sau *semidominanţă*, iar dacă ambele alele diferite se exprimă (de exemplu, în cazul alelelor HLA sau genelor A şi B pentru grupul sangvin AB0), termenul de *codominanţă*. Totuşi, în cazul bolilor monogenice aceşti termeni sunt rar folosiţi.

(5) Distincţia dintre dominant şi recesiv, în cazul caracterelor/bolilor legate de X, se estompează datorită fenomenului de inactivare (lyonizare) a unui cromozom X (inactivare precoce în viaţa embrionară, întâmplătoare şi definitivă). Într-adevăr, purtătoarele (heterozigotele X^a/X^N pentru boli recesive legate de X) manifestă adesea unele semne, atunci când sunt comparate cu bărbaţii X^aY afectaţi, iar heterozigotele pentru boli dominante legate de X sunt mai uşor şi variabil afectate. Explicaţia este deja cunoscută (vezi capitolele 2.C.2 şi 4.D.1.2): o femeie heterozigotă pentru un caracter legat de X este un *mozaic* de celule care exprimă fie alela normală, fie alela anormală; în funcţie de proporţia şi localizarea celulelor cu X^a activ apar semne variate de boală.

(6) În sfârşit, vom sublinia faptul că, în practica medicală, modelul de transmitere ereditară a unei boli *poate fi rareori definit fără ambiguitate într-o singură familie*! Familiile umane au de obicei un număr limitat de membri, mai ales când apar şi copii afectaţi, iar multe afecţiuni genetice pot fi consecinţa unei mutaţii noi sau pot prezenta fenomenul de heterogenitate genetică. De aceea, determinarea modului de transmitere, deşi este foarte importantă pentru sfatul genetic, constituie cel mai adesea *o ipoteză de lucru* şi nu un fapt stabilit. Numai atunci când gena a fost clonată şi mutaţia cauzatoare de boală poate fi determinată prin analiza ADN este posibilă stabilirea certă a modului de transmitere a mutaţiei. În celelalte cazuri, un diagnostic precis ne pretinde să consultăm *OMIM*, unde intrările cu un mod de transmitere ereditară bine stabilit sunt notate cu asterisc.

53. Excepţie fac genele „pseudoautozomale" care au alele funcţionale atât pe X, cât şi pe Y.
54. În genetica formală se recomandă ca alelele ce determină caractere dominante să fie notate cu majuscule, iar alelele ce determină caractere recesive cu litere mici. Noi preferăm simbolurile *A* sau *a*, pentru genele mutante şi *N* sau *n* pentru cele normale.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 6.5. Transmiterea dominantă autozomală a unui caracter patologic
Sănătoşi (*n/n*) şi bolnavi (*A/A*; *A/n*)

Combinaţii genotipice parentale	Gameţi	Descendenţi	
		Genotipuri	Fenotipuri (*indiferent de sex*)
1. *n/n* + *n/n*	n × n	*n/n*	toţi sănătoşi
2. *A/n* + *n/n*	(A+n) × n	½ *A/n* ½ *n/n*	½ bolnavi ½ sănătoşi
3. *A/n* + *A/n*	(A+n) × (A+n)	¼ *A/A*; ½ *A/n* ¼ *n/n*	¾ bolnavi ¼ sănătoşi (indiferent de sex)
4. *A/A* + *n/n*	A × n	*A/n*	toţi bolnavi
5. *A/A* + *A/n*	A × (A+n)	½ *A/A*; ½ *A/n*	toţi bolnavi
6. *A/A* + *A/A*	A × A	*A/A*	toţi bolnavi

(7) Pentru înţelegerea termenilor ce vor fi folosiţi în analiza transmiterii monogenice este necesară cunoaşterea datelor esenţiale privind structura şi funcţia genei, prezentate în capitolele 3.A şi 4.A, precum şi a terminologiei de bază.

2.2. *Transmiterea autozomal dominantă*

Mai mult de 50% dintre intrările incluse în *OMIM* reprezintă caractere transmise autozomal dominant (AD), iar bolile AD afectează, la diverse vârste, circa 20 din 1.000 de nou-născuţi. Multe dintre ele sunt frecvente şi redutabile prin consecinţele lor: *hipercolesterolemia familială, boala polichistică renală autozomal dominantă a adultului (ADPKD), neurofibromatoza 1, boala Huntington, polipoza adenomatoasă familială, cancerele ereditare de sân sau colon* etc.

a) Caracteristici şi criterii de transmitere AD

Un caracter dominant este determinat de interacţiunile între o pereche de alele, situată în loci omologi, pe unul dintre *autozomi*. Una din alele suferă o mutaţie (*A*) şi se manifestă fenotipic (clinic) la heterozigoţi (*A/n*), deoarece funcţia alelei normale (*n*) este insuficientă pentru a compensa efectul alelei mutante. Cele două alele *A* şi *n* pot forma trei genotipuri: *A/n* (mai frecvent), *A/A* (mai rar) şi *n/n*; primele două genotipuri vor determina un fenotip anormal (o boală) autozomal dominant, ce va fi imprimat în mod egal bărbaţilor şi femeilor.

Teoretic, cele trei genotipuri pot realiza *şase* combinaţii sau tipuri de încrucişări (tabelul 6.5), dar practic, frecvenţa lor într-o populaţie depinde de severitatea manifestării clinice, care determină sau nu supravieţuirea până la vârsta adultă şi capacitatea reproductivă (fertilitatea). Evident, primele două combinaţii sunt cele mai frecvente, a treia este rară şi, împreună cu următoarele trei (rarisime), se întâlnesc în familiile mari, numai pentru boli „uşoare" (de exemplu, *brahidactilia, hemeralopia, prognatismul*) sau pentru cele cu debut tardiv (după 40 de ani).

Din analiza acestor combinaţii/încrucişări rezultă o serie de caracteristici (reguli) ale transmiterii autozomal dominante.

Doi indivizi sănătoşi (n/n + n/n) nu pot avea copii cu afecţiuni AD ceea ce înseamnă că boala nu este transmisă prin persoane neafectate deoarece, teoretic, *nu există purtători sănătoşi de genă mutantă.* Această regulă are şi excepţii: producerea unor mutaţii (AD) germinale noi (în gametogeneza unuia dintre părinţii sănătoşi) poate determina apariţia unui copil afectat; există, de asemenea, „abateri" determinate de heterogenitatea genetică de locus (mutaţii diferite, dominante şi recesive, pot da acelaşi fenotip; de exemplu, în *retinita pigmentară*) sau de genotipul unuia dintre părinţii sănătoşi care este în realitate *A/n*, dar alela *A* nu se exprimă deloc fenotipic (non-penetranţă) sau se va exprima mai târziu decât la copilul afectat (anticipaţie). În acelaşi context, se pot include şi cazurile de non-paternitate (în care tatăl nelegitim este *A/n*).

Din încrucişarea dintre un bolnav heterozigot (*A/n*) şi unul sănătos (*n/n*) rezultă, teoretic, 50% bolnavi (*A/n*) şi 50% sănătoşi (*n/n*). Rezultatul acestei încrucişări ne permite să formulăm altă regulă de bază ale transmiterii AD: fiecare bolnav are (cel puţin) un părinte afectat; cu alte cuvinte, *boala este prezentă în fiecare generaţie*, iar în arborele genealogic al unei familii (suficient de mare) putându-se observa o frecvenţă relativ ridicată a bolnavilor şi o *transmitere verticală* (figura 6.21). Aceste caracteristici, şi mai ales *continuitatea bolii în succesiunea generaţiilor*, se observă frecvent în bolile AD mai puţin severe, compatibile cu reproducerea şi, deseori, la cele cu debut tardiv.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

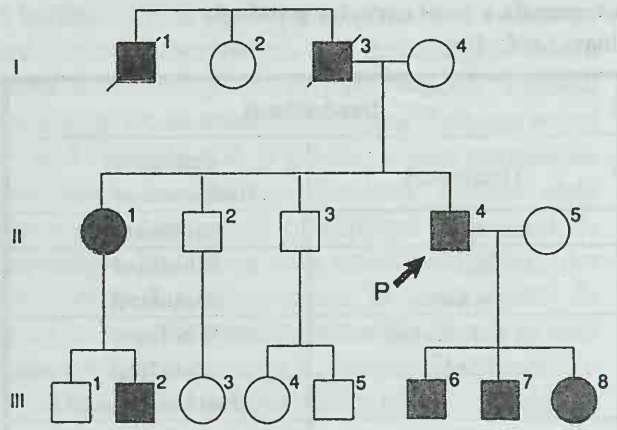


Figura 6.21. Arborele genealogic al unei familii cu o boală autozomal dominantă (hipercolesterolemia familială)

Boala se manifestă (cu o frecvență și o severitate relativ egală) atât la bărbați, cât și la femei, iar alela mutantă (situată pe un autozom) poate fi moștenită și transmisă cu o probabilitate egală de către ambele sexe (deci independent de sex). Toate acestea pledează pentru o transmitere autozomală. În plus, *transmiterea tată → fiu este posibilă*; deși acest criteriu nu este obligatoriu pentru transmiterea AD, prezența lui exclude alte tipuri de transmitere.

Evident, de la aceste reguli există și excepții, care complică interpretarea, și pe care le vom discuta mai jos; este vorba de mutații noi, mozaicuri germinale, penetranță redusă, anticipație ș.a.m.d.

Acum însă vom sublinia alt element important: fiecare bolnav, heterozigot (situația cea mai frecventă în bolile AD), are un risc de 50% de a avea descendenți afectați dacă alela mutantă are o penetranță completă. Acest *risc de 50% este valabil la fiecare sarcină* (ca eveniment *independent*), indiferent dacă anterior s-a născut un copil normal sau afectat. Dar transmiterea gameților, la fel ca și aruncarea unei monede, fiind supusă *fluctuațiilor întâmplării,* este posibil, spre exemplu, ca toți copiii (III-6, III-7, III-8, în figura 6.21) sau nici unul dintre ei să fie afectați.

În transmiterea bolilor AD se poate întâlni uneori situația încrucișării dintre doi bolnavi heterozigoți *A/n x A/n* (combinația 3 în tabelul 6.5) din care pot rezulta indivizi afectați și homozigoți (situațiile 5 și 6 din tabelul 6.5 sunt aproape numai teoretice). În multe boli AD (*hipercolesterolemia familială, acondroplazia, sindromul Marfan* ș.a.) *homozigoții sunt mai grav afectați* decât heterozigoții. Spre deosebire de aceste boli cu semidominanță (*A/A > A/n > n/n*) există și cazuri de boli cu dominanță completă (în care *A/A=A/n*), iar exemplul cel mai cunoscut este cel al *bolii Huntington*. Revenind la situația rară a încrucișării dintre doi bolnavi heterozigoți vom semnala, ca o caracteristică a bolilor dominante, faptul că ei pot avea descendenți sănătoși care, în bolile AD, vor fi și fete (!) și băieți.

Pe baza datelor discutate mai sus se pot formula următoarele *criterii privind transmiterea autozomal dominantă*:

- fiecare bolnav are, de obicei, un părinte afectat;
- orice bolnav are un *risc de 50%* de a transmite boala copiilor săi, acest risc fiind valabil la fiecare sarcină;
- fenotipul anormal apare în fiecare generație (continuitate în succesiunea generațiilor), iar în arborele genealogic se observă o transmitere verticală;
- indivizii sănătoși nu transmit boala;
- boala se manifestă (cu o frecvență și o severitate relativ egale) atât la bărbați, cât și la femei, iar alela mutantă poate fi moștenită și transmisă cu o probabilitate egală de către ambele sexe (deci independent de sex, cu o excepție – bolile care predomină sau sunt limitate la un sex);
- *transmiterea tată → fiu este posibilă* și caracteristică ereditații AD;
- doi bolnavi (cu o afecțiune compatibilă cu supraviețuirea și reproducerea) pot avea descendenți sănătoși, fete și băieți, iar dintre copiii afectați o parte pot fi homozigoți, cu o formă mai gravă de boală.

Pe lângă aceste criterii majore ale transmiterii AD, în arborii genealogici există și alte indicii pentru acest mod de transmitere: frecvența crescută a bolnavilor sau absența legăturilor consangvine.

b) Excepții de la regulile transmiterii AD

(1) Penetranța redusă. În bolile AD, mai ales cele cu pleiotropie și expresivitate clinică variabilă (vezi capitolul 4.A), uneori un individ deși moștenește alela mutantă nu o manifestă fenotipic; el putând însă să o transmită la descendenți, care pot fi afectați (figura 6.22.A; la subiectul II.1 alela mutantă este *non-penetrantă*, nu se manifestă clinic, dar se transmite). Se realizează astfel un „salt" peste generația parentală, aparent sănătoasă. Dacă alela mutantă se manifestă la toți heterozigoții (*A/n*), atunci are o **penetranță completă**; dacă manifestarea ei este sub 100%, atunci alela mutantă are o **penetranță incompletă**.

Penetranța se poate *măsura cantitativ* prin determinarea proporției heterozigoților (*A/n*) care exprimă fenotipic alela mutantă din totalul „purtătorilor obligatorii" de mutație. În exemplul din figura 6.22.A, penetranța este de ¾, deci 75% sau 0,75. Cunoașterea penetranței este importantă în sfatul genetic deoarece riscul unui bolnav cu o afecțiune AD cu penetranță redusă (de exemplu, 0,75) de a avea copii afectați este mai mic de 0,5 (50%), fiind 0,5 × 0,75 = 0,37. În acest

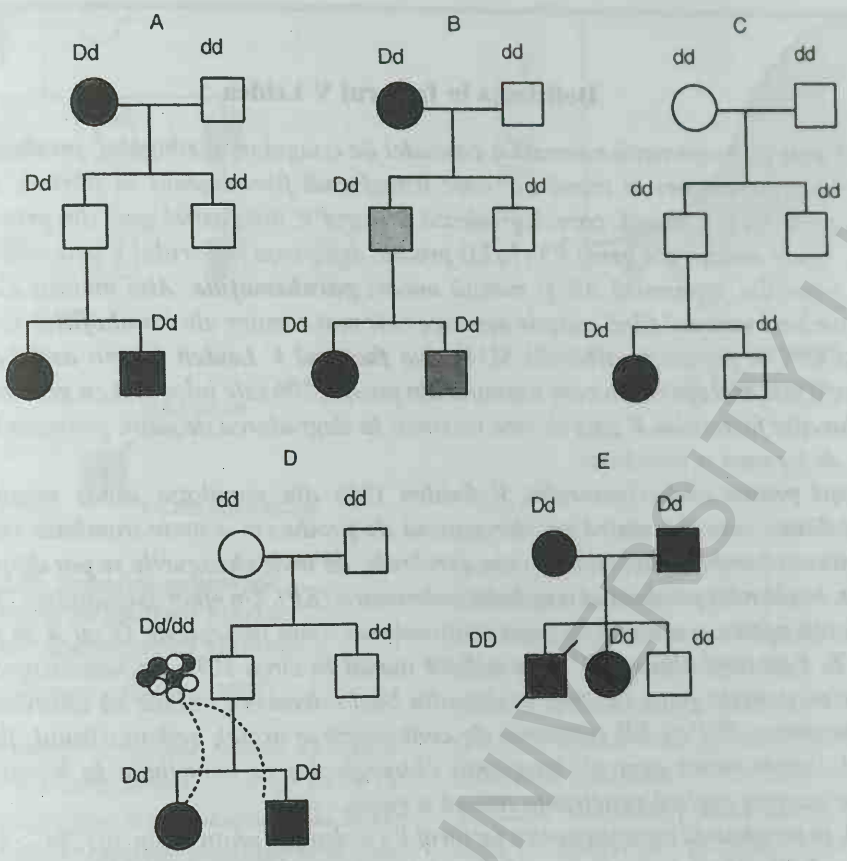


Figura 6.22. Prezentări atipice de ereditate autozomal dominantă

(după Wilson, 2000)

context, vom preciza, din nou, că este foarte important să facem diferența dintre o mutație cu penetranță redusă (cu risc suficient de mare, chiar dacă este sub cel teoretic de 50%) și o mutație nouă (cu risc mic de recurență); în acest scop, vom folosi toate mijloacele posibile de diagnostic presimptomatic.

La nivel individual, penetranța este o noțiune cantitativă (de tipul „totul sau nimic"), care se referă la expresia clinică a genei mutante (prezentă sau absentă), ce poate fi influențată de diferiți factori: metoda de diagnostic, vârsta de debut, sexul.

- *Metoda de diagnostic* este decisivă pentru a stabili dacă o alelă se manifestă sau nu. De exemplu, *în boala polichistică renală a adultului (ADPKD)* o persoană tânără, ce a moștenit alela mutantă, poate să nu prezinte ecografic chişti renali vizibili (cu dimensiuni prea mici), dar ei ar putea fi puși în evidență prin CT sau RMN. Într-un anumit sens, penetranța ar putea fi considerată „un artefact" determinat de abilitatea noastră de a *recunoaște* (clinic și/sau paraclinic) expresia sau fenotipul alelei mutante.
- *Vârsta de debut* a primelor manifestări clinice este variabilă în multe boli AD (vezi mai jos); vom menționa aici că în *boala Huntington* penetranța alelei mutante este zero la naștere, 25% la 30 de ani, 50% la 40 de ani și 100% la 70 de ani.
- *Sexul persoanei* poate uneori influența manifestarea alelei mutante; de exemplu, în *cancerul de sân familial produs prin mutația genei BRCA2*, penetranța alelei este redusă la bărbați al căror țesut glandular este redus și nedependent de stimularea hormonală.

Cauzele penetranței reduse, incomplete, nu sunt clare; se prezumă intervenția unor factori genetici și de mediu, care pot avea – într-o anumită conjunctură – un efect antagonic, „supresor", asupra manifestării unei gene. Un exemplu edificator este *deficiența în factorul V Leiden*, prezentată în caseta 6.4; vom mai adăuga faptul că în *hipercolesterolemia familială* depozitele de colesterol din pereții vaselor sangvine, ce determină simptomatologia principală a bolii, pot fi reduse de o dietă sau o medicație adecvată (statine); vom aminti, de asemenea, „bolile induse de medicamente" (farmacogenetica) – precum *porfiria acută intermitentă* sau *hipertermia malignă* – care vor fi „declanșate" numai în anumite condiții de mediu (vezi capitolul 9.B.3).

(2) Mutații germinale noi. Pacienții afectați pot fi primul și singurul caz de boală AD din familie; în

BCU "VICTOR BABEȘ" UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 6.4 *OMIM # 227400*

Deficiența în factorul V Leiden

***Factorul V** este o componentă normală a cascadei de coagulare a sângelui, producând (în prezența Ca^{2+}) activarea protrombinei în trombină, care transformă fibrinogenul în fibrină; coagularea este controlată de proteina C activată, care degradează factorul V, fiind astfel unul din principalii inhibitori ai coagulării. Unele mutații ale genei F5 (1q23) produc deficiența factorului V asociată cu o formă rară și ușoară de hemofilie, transmisă AR și numită uneori **parahemofilie**. Alte mutații ale genei F5 sunt asociate cu tromboză venoasă fiind cauzele genetice cele mai comune ale **trombofiliei**. Cea mai frecventă dintre acestea (5% în populația albă din SUA) este **factorul V Leiden** (numit astfel după orașul din Olanda în care a fost descoperit) în care arginina din poziția 506 este înlocuită cu glutamina. Se produce o alterare a funcției factorului V care devine rezistent la degradarea de către proteina C, rămâne activ și crește rata de formare a trombinei.*

Heterozigoții pentru alela factorului V Leiden (5% din populația albă) prezintă o stare de hipercoagulabilitate, care determină un risc crescut de producere a unor tromboze venoase profunde (TVP) periferice, la membrele inferioare[55], sau cerebrale, de unde cheagurile se pot desprinde și ajunge, prin circulație, în plămâni producând o embolie pulmonară (EP). Un efect asemănător (TVP) se produce și la heterozigoții pentru o mutație în gena protrombinei, care înlocuiește G cu A în poziția 20120 a regiunii 3'UTR. Fenotipul clinic TVP se manifestă numai la circa 50% din heterozigoți, deci nu orice persoană care moștenește gena mutantă va dezvolta boala deoarece trebuie să intervină alți factori de risc din mediu pentru TVP și EP (folosirea de contraceptive orale), sedentarismul, fumatul, sarcina, prezența unui cateter venos central, intervenții chirurgicale) ce contribuie la hipercoagulabilitatea sângelui; toate acestea explică penetranța redusă a genei.

În practică, se recomandă testarea pentru factorul V Leiden sau protrombin 20120G>A la toți pacienții care au: TVP sub 50 ani, mai ales recurentă și cu istoric familial poziti; TVP la gravide sau la femei ce iau contraceptive; femei fumătoare sub 50 de ani ce fac infarct miocardic acut.

această situație se presupune că apariția bolnavului din părinți sănătoși și homozigoți (*n/n*) (figura 6.22.C) este consecința unei *mutații spontane noi (neomutații)* apărute în timpul gametogenezei, de obicei la bărbat. Această ipoteză va fi luată în considerare doar după ce s-au eliminat celelalte posibilități: penetranța redusă, expresivitatea variabilă și non-paternitatea.

De altfel, mutațiile noi sunt frecvente în numeroase boli AD care, datorită gravității handicapului clinic sau reducerii până la anulare a capacității reproductive, nu pot fi transmise de la părinți la descendenți. În *osteogenesis imperfecta tipul II (OMIM # 166200)*, boală AD – caracterizată prin fragilitate osoasă – letală perinatal, toate cazurile reprezintă mutații noi. Un alt exemplu frecvent citat este al *acondroplaziei (OMIM # 100800)* – un nanism disproporționat pe seama membrelor, foarte scurte, în care se apreciază că 80% dintre cazuri sunt produse prin neomutații. În *neurofibromatoză* acestea reprezintă 50% din cazuri.

c) Expresivitatea variabilă

Expresivitatea, spre deosebire de penetranță, este o noțiune calitativă care definește gradul, intensitatea, natura, severitatea manifestării fenotipice a unei alele mutante și penetrante la bolnavi diferiți. Atunci când acești parametri sunt diferiți pentru expresia unei alele mutante se folosește termenul **expresivitate variabilă** (figura 6.22.B). Ea poate fi prezentă la bolnavii din aceeași familie (care au deci aceeași mutație) sau din familii diferite (care ar putea avea mutații diferite în aceeași genă)

Expresivitatea variabilă interesează: spectrul de manifestare a simptomelor și distribuția lor; vârsta de debut a semnelor; intensitatea (severitatea) exprimării; limitarea manifestării la pacienții de un anumit sex.

(1) Spectrul manifestării simptomelor și distribuția lor. Numeroase boli AD, mai ales cele cu pleiotropie (manifestări variate în organe multiple), prezintă o expresivitate variabilă. În capitolul 4.A.4.2 exemplificam acest concept la bolnavii cu sindrom Marfan (caseta 4.1), la care nu apar întotdeauna toate anomaliile celor trei sisteme afectate (schelet, ochi, aparat cardiovascular) sau la care severitatea clinică este diferită; prezentăm acum un arbore genealogic ilustrativ (figura 6.23) în care toți indivizii vii afectați au *aceeași mutație* în gena fibrilinei, dar prezintă o variabilitate marcată în vârsta de debut,

55. Circa 40% din indivizii care fac TVP sunt heterozigoți pentru alela factorului V Leiden.

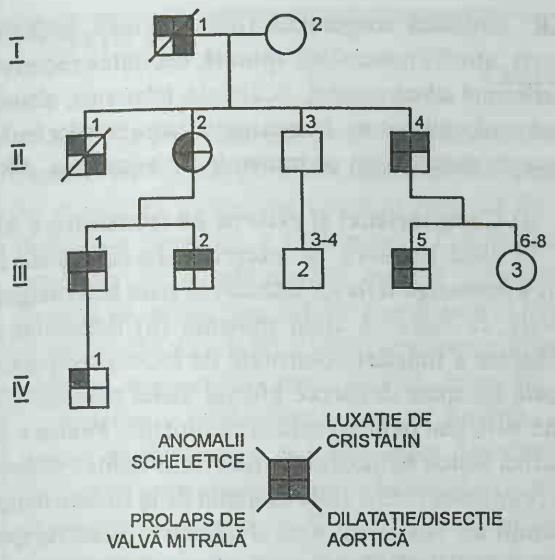


Figura 6.23. Arborele genealogic al unei familii cu sindrom Marfan ce ilustrează expresivitatea variabilă

(după Gelherter și Collins, 1998)

distribuția și severitatea semnelor. Un alt exemplu ilustrativ este cel al *neurofibromatozei tip I* (*NF1*) sau boala Von Recklinghausen (vezi capitolul 11.E.1), care prezintă manifestări cutanate (multiple pete *café au lait*, pistrui axilari ș.a), oftalmologice (noduli Lisch în iris ș.a.), musculoscheletice (scolioză, statură mică ș.a.), neuropsihiatrice (dificultăți de învățare sau retard mental, convulsii etc.) și tumorale (neurofibroame de diverse mărimi, glioame ale căii optice sau SNC, feocromocitoame ș.a.). Toate aceste modificări se dezvoltă la vârste diferite (primele semne ce apar la copii sunt petele multiple *café au lait*) și au o mare variabilitate a distribuției și severității.

Modul și gradul (severitatea) de manifestare a unei boli AD determinată de o anumită alelă mutantă *nu poate fi prezis*, nici chiar la bolnavii din aceeași familie, care au aceeași mutație genică. În schimb, cunoașterea întregului *spectru de manifestare* al unei boli monogenice AD permite evaluarea și diagnosticul complet al unui pacient, precum și cercetarea unor cazuri oligo- sau mono-simptomatice, puțin evidente, în familie. Toate acestea vor influența calitatea diagnosticului, conduita medicală, prevenția unor complicații și acuratețea sfatului genetic.

(2) Vârsta de debut a semnelor. O problemă corelată cu expresivitatea variabilă este vârsta de debut a manifestărilor unor boli AD pleiotrope. Diversele semne apar în timp, la vârste diferite (penetranță dependentă de vârstă); uneori primele manifestări ale unor boli (ca *ADPKD, hipercolesterolemia familială, polipoza de colon, boala Huntington* ș.a.) apar tardiv la adult. În figura 6.24 prezentăm exemplul

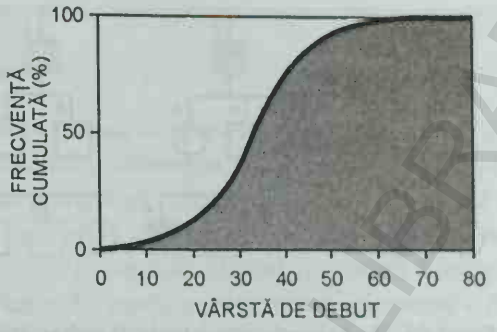


Figura 6.24. Vârsta variabilă de debut a bolii Huntington

(după Gelherter și Collins, 1998)

clasic al *coreei Huntington* – o boală degenerativă neurologică caracterizată prin mișcări anormale (coree) și pierderea progresivă a funcțiilor mentale (demență), în care primele semne apar în medie la 35 de ani. Persoana care a moștenit alela mutantă este mult timp asimptomatică, fără să știe că posedă mutația în momentul în care își alcătuiește o familie și decide să aibă copii (cărora, evident, le poate transmite alela anormală). Acest lucru scoate în evidență utilitatea anamnezei familiale și importanța unor teste de diagnostic presimptomatic (vezi capitolul 18).

În acest context, vom menționa și fenomenul de **anticipație**: în unele afecțiuni AD, semnele de boală se manifestă în generații succesive la o vârstă tot mai precoce și deseori cu o severitate tot mai mare. Mult timp, existența anticipației a stat sub semnul îndoielii, dar astăzi se știe că este un fenomen cert, mai ales în *bolile prin amplificarea repetițiilor trinucleotidice* (vezi capitolele 7.B.1.4 și 12.C), în care numărul acestor expansiuni instabile crește în succesiunea generațiilor determinând o vârstă de debut tot mai precoce și o severitate mai mare.

(3) Limitarea manifestării la pacienții de un anumit sex. Expresivitatea variabilă a unor boli poate să se manifeste și prin afectarea predominantă (sau chiar limitată) a unui anumit sex. Ne refeream mai sus la *cancerul de sân familial produs prin mutația genei BRCA2*, care este foarte rar la bărbați, dar sunt și alte exemple de boli AD manifeste la un anumit sex; vom mai cita: *porfiria acută intermitentă* predominantă la sexul feminin sau *pubertatea precoce familială*, limitată la sexul masculin.

> În acest ultim exemplu, pubertatea apare precoce la 4-5 ani, datorită unei mutații a receptorului pentru hormonul luteinizant care, așa cum se observă în figura 6.25., se transmite AD (vezi transmiterea tată → fiu), dar gena este nemanifestă la persoanele de sex feminin (I-1, II-1, II-5) care o moștenesc și o transmit la descendenți.

EDITURA UNIVERSITARĂ

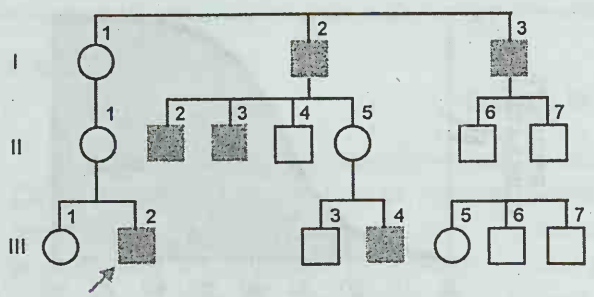


Figura 6.25. Arborele genealogic al pubertății precoce familiale

(modificat după Thompson *et al.*, 1991)

Cauzele expresivității variabile sunt greu de definit. Sigur, la bolnavii cu aceeaşi afecțiune, dar din familii diferite, prima explicație a expresivității variabile poate fi *heterogenitatea alelică*, deci existența unor mutații diferite. De exemplu, în *osteogenesis imperfecta* mutațiile care afectează aminoacizii dinspre capătul carboxil al moleculei de procolagen vor da forme mai grave de boală decât cele care afectează aminoacizii dinspre capătul aminoterminal.

Pentru bolnavii din aceeaşi familie sau din familii diferite, care au aceeaşi mutație, cauzele fenomenului sunt însă altele. Se invocă interacțiunea alelei mutante cu alte *gene modificatoare* (caseta 6.5) şi/sau cu unii *factori de mediu*; o dovadă indirectă a existenței genelor modificatoare o reprezintă expresia mai frecventă/predominantă sau exclusivă/limitată a unor gene autozomale la un anumit sex.

2.3. *Transmiterea autozomal recesivă*

Circa 1/3 din caracterele monogenice sunt transmise autozomal recesiv (AR). Cele mai frecvente boli AR în populația europeană sunt hemocromatoza şi fibroza chistică sau mucoviscidoza. Alte afecțiuni AR: surditatea congenitală (unele forme), fenilcetonuria, atrofia musculară spinală, cecitatea recesivă, sindromul adrenogenital, sicklemia, talasemia, albinismul oculo-cutanat etc. Marea majoritate a erorilor înnăscute de metabolism se transmit, de asemenea, AR.

a) Caracteristici şi criterii de transmitere AR

O alelă recesivă îşi exercită efectul *numai în stare homozigotă (a/a)*, întrucât în stare heterozigotă (*N/a*), cu toate că alela mutantă (*a*) determină o reducere a funcției controlate de locusul respectiv, boala nu apare deoarece efectul alelei normale (*N*) este suficient pentru realizarea funcției. Pentru a se realiza starea homozigotă, individul bolnav trebuie să primească câte o alelă mutantă de la fiecare dintre părinții săi. Astfel, în cazul afecțiunilor recesive, spre deosebire de cele dominante, *moştenirea se face prin ambii părinți* care, în cea mai mare parte a cazurilor, sunt sănătoşi şi **purtători** de alelă mutantă, deci heterozigoți (*N/a+N/a*). După cum se observă din tabelul 6.6 (poziția 1), în descendența lor rezultă teoretic un raport fenotipic de 3 sănătoşi la 1 bolnav; acest raport se verifică însă numai în cazul unor afecțiuni mai frecvente, puțin severe, şi în familiile mari sau cumulând datele obținute de la mai multe familii[56].

Din datele prezentate mai sus se poate formula o regulă importantă a transmiterii autozomal recesive: *doi părinți sănătoşi, heterozigoți pentru aceeaşi pereche de alele, pot avea copii (fete şi băieți) bolnavi cu o anomalie AR*. De subliniat faptul că ambele sexe sunt afectate în proporții cvasi egale şi pot transmite alela mutantă cu aceeaşi probabilitate (elemente logice pentru localizarea autozomală a genei).

Deoarece părinții bolnavului sunt sănătoşi, în arborele genealogic (figura 6.26) se înregistrează *o discontinuitate a bolii în succesiunea generațiilor*. Bolnavul poate fi singurul membru afectat al familiei[57];

Tabel 6.6. Transmiterea autozomal recesivă a unui caracter patologic

Genotipurile indivizilor sănătoşi sunt N/N şi N/a, iar cel al bolnavilor este a/a.

Combinații genotipice parentale	Gameți	Descendenți	
		Genotipuri	Fenotipuri
1. *N/a* × *N/a*	(*N* + *a*) × (*N* + *a*)	¼ *N/N* ; ½ *N/a* ¼ *a/a*	¾ sănătoşi, din care ²/₃ purtători ¼ bolnavi, indiferent de sex
2. *N/a* × *N/N*	(*N* + *a*) × (*N*)	½ *N/N* ; ½ *N/a*	Toți sănătoți, ½ purtători
3. *a/a* × *N/N*	(*a*) × (*N*)	*N/a*	Toți sănătoşi şi purtători
4. *a/a* × *N/a*	(*a*) × (*N* + *a*)	½ *N/a*; ½ *a/a*	½ sănătoşi şi purtători, ½ bolnavi
5. *a/a* × *a/a*	(*a*) × (*a*)	*a/a*	Toți bolnavi

56. După adunarea datelor se impune o prelucrare şi o corecție statistică pentru a compensa pierderea de informații determinată de fratriile ce provin din căsătorii între heterozigoți şi care nu au nici un bolnav; altfel, proporția de homozigoți afectați va fi mai mare de 25%.

57. Se realizează aspectul unui caz izolat/sporadic, dar ar fi o greşeală să considerăm că boala nu este ereditară numai pentru că nu sunt alte cazuri în familie.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 6.5

Genele modificatoare

Multe boli mendeliene prezintă diferențe în ceea ce privește vârsta de apariție, severitatea bolii și alte caracteristici fenotipice. De fapt, expresia unitară/identică a unor asemenea boli pare să fie excepția și nu regula (o asemenea excepție pare să fie de exemplu albinismul, boală genetică determinată de deficiența completă a tirozinazei). Printre factorii care determină această diversitate fenotipică sunt implicate variantele alelice, mediul și genele modificatoare. Exemplele privind variantele alelice și factorii de mediu sunt relativ numeroase și bine caracterizate. Existența unor gene modificatoare a fost inițial postulată odată cu descrierea unor diferențe fenotipice la purtătorii aceleiași variante alelice și în absența intervenției unor factori de mediu. Asemenea gene modificatoare pot afecta penetranța, expresivitatea și pleiotropia sau pot modifica dominanța unor mutații. În funcție de natura efectului lor, genele modificatoare pot determina fenotipuri mai severe, mai puțin severe sau chiar fenotipuri noi. Epistazia, care apare atunci când o alelă a unei gene maschează fenotipul unei alte gene, este o formă de modificare genetică. Deși sunt probabil extrem de numeroase, numărul genelor modificatoare bine documentate la om este în prezent relativ redus.

- *Gene modificatoare ale penetranței. Deși penetranța incompletă este o trăsătură comună a numeroase boli mendeliene, există puține exemple pentru care să se știe că variabilitatea pentranței se datorează unor gene independente. Un exemplu a fost descris în cazul surdității non-sindromice determinată de mutații ale genei DFNB26 de pe cromozomul 4q31. Au fost descrise cazuri în care indivizi homozigoți pentru mutația prezentă în familie au totuși auz normal. La acești indivizi a fost cartografiată o genă modificatoare dominantă localizată pe cromozomul 7 care reduce penetranța mutației cauzatoare de boală. De asemeni, pe cromozomul 8, în apropierea markerului D8S277, a fost localizată o genă care modifică penetranța mutației 1555A>G de la nivelul genei mitocondriale pentru ARNr 12S, ce produce surditatea transmisă matriliniar.*
- *Gene modificatoare ale dominanței. Una dintre mutațiile implicate în producerea retinitei pigmentare cu transmitere autozomal recesivă este cea a genei pentru periferina-1 (PRP1). Au fost însă descrise cazuri în care mutații heterozigote ale acestei gene se însoțesc de prezența bolii, deși se aștepta ca numai indivizii homozigoți să fie bolnavi. Aceste cazuri au fost explicate prin asocierea unor variante alelice la nivelul genei neînlănțuite ROM1 (care codifică proteina 1 a porțiunii externe a celulelor cu bastonaș de la nivelul retinei). Ca urmare, o alelă care are în mod normal un efect recesiv în producerea retinitei pigmentare poate să acționeze ca o alelă dominantă atunci când se asociază o alelă particulară a genei neînlănțuite ROM1.*
- *Expresivitatea variabilă. Un exemplu de genă modificatoare implicată în producerea expresivității variabile este cel al hipercolesterolemiei familiale, boală transmisă autozomal dominant care afectează una din 500 de persoane din populația generală și determină o creștere semnificativă a riscului pentru bolile cardiovasculare ca urmare a creșterii colesterolemiei. S-a constatat că unii purtători heterozigoți pentru mutația cauzatoare de boală au un nivel al colesterolemiei care este cu 25% mai mic decât cel așteptat. La asemenea indivizi a fost cartografiată o genă modificatoare localizată pe cromozomul 13q. Un alt exemplu este fibroza chistică la care severitatea manifestărilor pulmonare (la bolnavii cu mutația cea mai frecventă, ΔF508) este dependentă de prezența sau absența unor gene modificatoare TGFβ1, MBL2, NOS1.*
- *Pleiotropia. Febra mediteraneană familială (FMF) este o boală autozomal recesivă comună în regiunea mediteraneană caracterizată prin febră recurentă și inflamația seroaselor. Boala este determinată de mutații ale genei pentru pirină/marenostrină. O complicație variabilă a acestei boli este asocierea amiloidozei renale ce conduce la insuficiență renală. Unele studii au arătat că asocierea variabilă a acestei complicații este explicată, cel puțin în parte, de unele variante polimorfice la nivelul genei pentru amiloidul A seric. De asemeni, o genă modificatoare a apariției ileusului meconial în cadrul fibrozei chistice a fost localizată la nivelul cromozomului 19q13.*

Deși pe de o parte fenomene precum dominanța incompletă, expresivitatea variabilă sau pleiotropia complică analiza genetică a caracterelor mendeliene, identificarea genelor modificatoare responsabile de asemenea fenomene se poate dovedi sursa unor noi metode de diagnostic, tratament și prevenție a bolilor genetice.

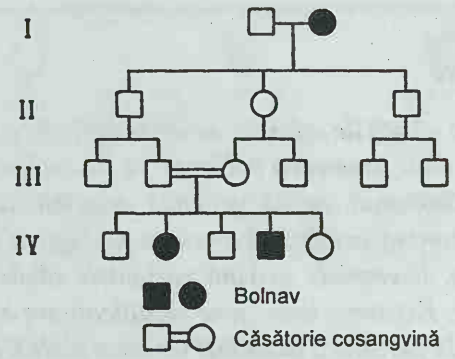


Figura 6.26. Arborele genealogic al unei boli autozomal recesive

dacă apar şi alte cazuri, ele se găsesc frecvent în aceeaşi fratrie, dând aspectul unei transmiteri *orizontale*.

Riscul unui cuplu de indivizi normali şi heterozigoţi de a avea un copil bolnav (*a/a*) este de 25% sau 1/4 la fiecare sarcină, ca eveniment independent. Ar fi greşit să credem că în familiile cu patru copii este obligatoriu ca numai unul să fie afectat, sau mai rău, dacă s-au născut trei copii sănătoşi al patrulea va fi bolnav. Pentru a înţelege de ce *riscul de 1/4 este valabil la fiecare sarcină* să ne imaginăm o loterie cu patru bile, trei albe şi una neagră, din care, la fiecare naştere, s-ar extrage o bilă; înaintea naşterii următoare „bila se pune la loc" şi tragerea se repetă. Uneori pot exista familii cu şansa de a avea 1-4 copii normali, alteori se pot naşte succesiv doi bolnavi.

În afara combinaţiei a doi heterozigoţi, alte încrucişări din care pot rezulta copii bolnavi sunt trecute în tabelul 6.6, în poziţiile 4 şi 5. Ocazional, un bolnav (*a/a*) se poate încrucişa cu un sănătos heterozigot (*N/a*) şi atunci 50% dintre descendenţi ar putea fi afectaţi; pe arborele genealogic se înregistrează un aspect de **pseudodominanţă**, boala fiind prezentă în două generaţii (figura 6.27). În sfârşit, mult mai rar, din *încrucişarea dintre doi bolnavi, homozigoţi pentru aceeaşi mutaţie* (*a/a* × *a/a*), *vor rezulta numai descendenţi bolnavi* (*a/a*). Acest tip de uniune „asortativă" se observă în colectivităţi speciale (deficienţi vizuali, surzi ş.a.) şi pentru boli ce nu afectează capacitatea reproductivă. De la regula enunţată mai sus fac excepţie situaţiile de heterogenitate genetică în care bolnavii cu afecţiuni asemănătoare clinic au mutaţii în gene (loci) diferite (figura 6.28); întrucât părinţii bolnavi nu sunt homozigoţi pentru aceeaşi mutaţie, descendenţii lor vor fi dublu heterozigoţi şi sănătoşi.

În afecţiunile autozomal recesive se observă că printre părinţii bolnavului există o proporţie mai mare de căsătorii între persoane care au cel puţin un strămoş comun (consangvinitate), în special între veri primari.

În concluzie, criteriile majore pentru diagnosticul eredităţii recesive autozomale la om sunt următoarele:

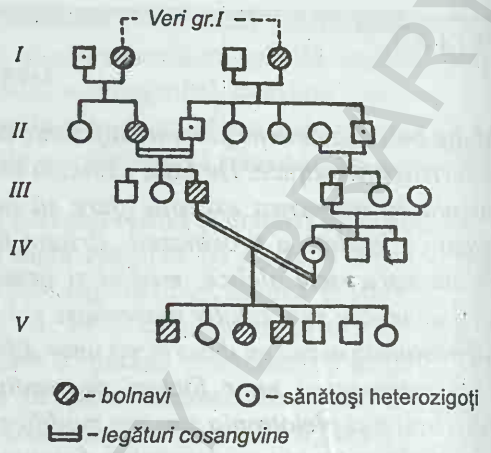


Figura 6.27. Arbore genealogic care ilustrează modul în care o afecţiune recesivă (alcaptonuria) mimează o transmitere dominantă (pseudodominanţă)

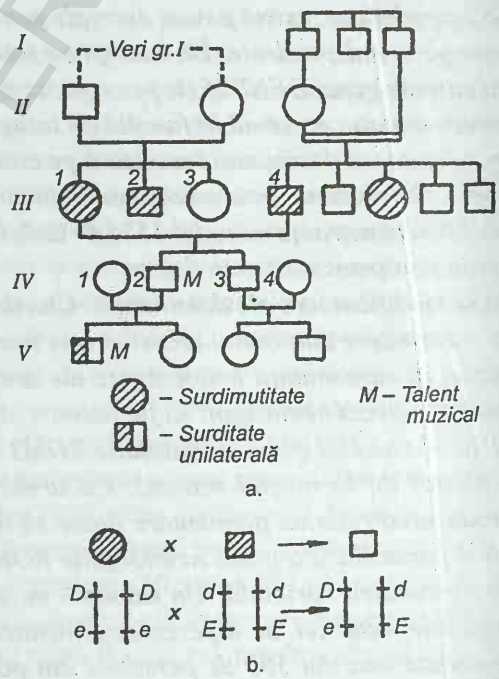


Figura 6.28. Arborele genealogic al unei familii cu surdimutitate (boală AR), care dovedeşte heterogenitatea genetică a bolii (a) şi posibilitatea naşterii de copii sănătoşi din părinţi bolnavi (b)

- marea majoritate a persoanelor afectate sunt urmaşi ai părinţilor aparent sănătoşi, dar heterozigoţi; riscul părinţilor de a avea un copil bolnav este 1/4, indiferent de sex;
- dacă bolnavii se căsătoresc cu persoane normale şi homozigote, toţi copiii vor fi sănătoşi; se înregistrează astfel aspectul de *discontinuitate* a bolii în succesiunea generaţiilor sau de cazuri izolate;
- dacă un bolnav se căsătoreşte cu o persoană sănătoasă şi heterozigotă, riscul de a avea descendenţi bolnavi, fete şi băieţi, este de 50% (pseudodominanţă); în acest caz, transmiterea mamă-fiică este posibilă;

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 6.7. Coeficientul de înrudire (r) și consangvinitate (F) în diferite tipuri de încrucișări între rude

Tip de încrucișare	Coeficient de înrudire (R)	Coeficient de consangvinitate (F)
Tată – fiică; frate – soră; gemeni dizigoți	1/2	1/4
Unchi – nepoată; demi-frate – demi-soră	1/4	1/8
Veri de gradul I; demi-unchi – demi-nepoată	1/8	1/16
Văr de gradul I – vară de gradul II; demi-veri primari	1/16	1/32
Veri de gradul II	1/32	1/64
Văr gradul II – vară gradul III	1/64	1/128
Veri de gradul III	1/128	1/256

- doi părinți bolnavi (homozigoți pentru aceeași genă) nu vor avea copii sănătoși;
- părinții copilului afectat sunt mai frecvent rude, comparativ cu părinții copiilor sănătoși (deci frecvența crescută a consangvinității).

În afara criteriilor enunțate mai sus, bolile AR se caracterizează prin faptul că sunt, în general, anomalii prin lipsă (hipoplazie, hipofuncție, deficit enzimatic etc.), deseori mai grave decât cele AD.

b) Consangvinitatea în afecțiunile recesive

Probabilitatea ca două persoane să fie purtătoare (*N/a*) ale aceleiași mutații crește dacă persoanele respective sunt înrudite pentru că fiecare poate moșteni alela mutantă de la un strămoș comun; această situație este numită **consangvinitate** și se notează în arborele genealogic printr-o linie dublă.

S-a observat că frecvența consangvinității parentale în bolile AR este invers proporțională cu frecvența genei recesive: *cu cât boala este mai rară, cu atât consangvinitatea la părinți este mai frecventă.* Astfel, în cazul unei afecțiuni cu o frecvență de 1:10.000 (albinismul), circa 6% dintre părinții copiilor bolnavi vor fi veri primari, față de 1% cât există în populația generală europeană. Procentul va crește la 16% dacă afecțiunea este de 10 ori mai rară (1:100.000).

Părinții înrudiți posedă un procentaj mai mare de gene identice, comparativ cu populația generală. Acest procent depinde de gradul de înrudire, fiind de 1/8 la verii primari, 1/32 la verii de gradul II ș.a.m.d. (tabelul 6.7).

Deoarece părinții înrudiți au un număr mai mare de alele (normale sau anormale) în comun, *consangvinitatea crește riscul de întâlnire a heterozigoților* și favorizează apariția subiecților homozigoți afectați. Astfel, dacă într-o populație frecvența heterozigoților pentru o afecțiune recesivă este 1/50, probabilitatea unei persoane de a avea un copil bolnav căsătorindu-se cu o persoană neînrudită este $1/50 \times 1/50 \times 1/4 = 1/10.000$; dacă s-ar căsători cu vara sa primară, atunci riscul nașterii unui copil afectat este $1/50 \times 1/8 \times 1/4 = 1/1.600$, deci de circa șase ori mai mare.

Se apreciază că *riscul global* al unui descendent anormal din căsătoria între veri primari este totuși mic (3-5%), aproape dublu față de cel al populației generale (2-3%). Consecințele unui incest (încrucișarea dintre rude de gradul I) sunt însă mult mai dezastruoase: ½ - ¼ dintre descendenți vor fi anormali (retardul mental fiind pe locul întâi).

c) Heterozigoții în afecțiunile recesive

Unul dintre cele mai importante aspecte legate de transmiterea AR îl constituie studiul și depistarea heterozigoților (*N/a*). Ei sunt fenotipic sănătoși și atunci când se căsătoresc cu un alt heterozigot sănătos au un risc de 25% de a avea un copil bolnav. Problema devine „acută" în familiile în care există un individ afectat de o boală recesivă. Probabilitatea ca o persoană să moștenească în acest caz alela anormală depinde de gradul înrudirii cu bolnavul (figura 6.29): cu cât este mai apropiat, cu atât riscul este mai mare. Astfel, fratele/sora unui bolnav cu o afecțiune recesivă are o probabilitate de 2/3 de a fi heterozigot; aceasta se reduce la 1/3 pentru copilul lor sănătos (nepot al bolnavului).

Întrucât alele recesive se transmit *nemanifeste* din generație în generație, până ce se realizează starea homozigotă, există riscul ca oricine să posede astfel

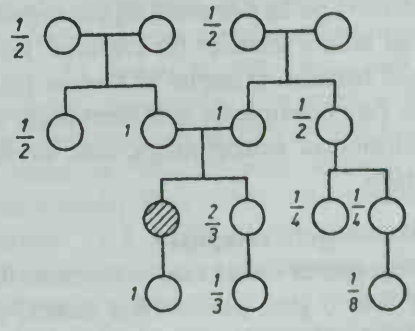


Figura 6.29. Probabilitatea rudelor homozigotului pentru o genă recesivă autozomală de a fi heterozigote

Sexul și celălalt partener nu modifică rezultatul și au fost excluse.Calculul moștenirii genei de la ascendenți s-a făcut pe baza șansei de 50% ca fiecare părinte să transmită gena la urmași

de alele şi deci să fie heterozigot. Acest risc se poate estima pe baza frecvenţei afecţiunii în populaţie (vezi capitolul 8) şi se poate calcula aproximativ după formula: $h = 2\sqrt{\text{frecvenţa bolii}}$; deci frecvenţa heterozigoţilor este de două ori rădăcina pătrată a frecvenţei afecţiunii în populaţie. De exemplu, dacă fenilcetonuria are o frecvenţă de 1:10.000, frecvenţa heterozigoţilor este de 1/50. Prevalenţa heterozigoţilor pentru unele afecţiuni AR mai frecvente este de 1/10 pentru *hemocromatoză* (1:400); 1/25 pentru *fibroza chistică* sau *mucoviscidoză* (1:2.500); 1/30 pentru *surdomutitate* (1:3.600); 1/35 pentru *sindromul adreno-genital* (1:5.000). Se observă că *în populaţie numărul heterozigoţilor este foarte mare comparativ cu cel al bolnavilor homozigoţi recesivi.* În aceste condiţii, posibilitatea întâlnirii a doi heterozigoţi este mare. Genele recesive morbide sunt deci relativ comune şi, pentru că sunt multe afecţiuni recesive, este probabil ca fiecare dintre noi să purtăm câteva alele anormale în stare heterozigotă.

În anumite populaţii, frecvenţa bolilor recesive şi deci cu atât mai mult a heterozigoţilor este foarte mare: *sicklemia* în Africa, *beta-talasemia* în Italia şi Grecia, *hemocromatoza* şi *fibroza chistică (mucoviscidoza)* în Europa de Vest şi Nord, *nefroza congenitală* în Finlanda, *boala Tay-Sachs* la evreii Aşkenazi (originari din centrul şi estul Europei). Explicaţiile acestui fenomen (avantajul selectiv al heterozigoţilor, efectul de fondator, izolarea etnică sau religioasă etc.) vor fi discutate în capitolul 8.

Aşa cum am mai spus, noţiunile de dominant şi recesiv sunt valabile pentru fenotip, pentru caracter, şi reprezintă o simplificare a relaţiilor moleculare, deoarece ambele alele ale genelor se manifestă întotdeauna la nivel molecular. Acest lucru permite *depistarea heterozigoţilor*, sănătoşi dar purtători, pentru acele afecţiuni la care se cunoaşte efectul primar al genei şi la care acesta poate fi evidenţiat. Ne vom referi pe larg la acest aspect important al profilaxiei bolilor genetice (în capitolul 19.4), dar acum vom reaminti exemplul sicklemiei (capitolul 4.B.1) în care heterozigoţii sunt identificaţi, simplu, prin electroforeza hemoglobinei, care evidenţiază HbA şi HbS.

d) Heterozigoţii compuşi

Heterogenitatea alelică este un fenomen frecvent în bolile AR: o genă poate suferi mutaţii diferite generând alele diferite. De exemplu, în beta-talasemie s-au identificat numeroase mutaţii în gena *HBB*; deseori, la bolnavi, cele două alele ale locilor *HBB* sunt anormale (*a/a*), dar au mutaţii diferite (*a1/a2*) şi aceştia sunt de fapt *heterozigoţi compuşi (a1/a2).* Se pare că, în cele mai multe dintre bolile recesive, indivizii afectaţi sunt în fapt mai curând heterozigoţi compuşi decât homozigoţi adevăraţi, exceptând evident situaţiile în care părinţii lor sunt înrudiţi şi au moştenit *aceeaşi mutaţie* de la un strămoş comun sau când în acea populaţie predomină o anumită mutaţie, ca urmare a efectului de fondator.

e) Variabilitatea în bolile recesive

Bolile recesive prezintă deseori o *penetranţă completă şi o variabilitate clinică redusă.* Există însă şi excepţii: în hemocromatoză (vezi caseta 3.1), de pildă, nu toţi bolnavii (*a/a*) dezvoltă boala, iar femeile sunt relativ protejate datorită pierderilor de fier din cursul menstruaţiei. De asemenea, în mucoviscidoză bolnavii pot avea o mare variabilitate a distribuţiei şi severităţii manifestărilor digestive, pulmonare etc. (vezi capitolul 12.E.2), explicabilă prin mutaţii diferite, specifice, ale genei *CFTR*; homozigoţii care au mutaţia F508del prezintă insuficienţă pancreatică, dar în alte mutaţii funcţia pancreatică este cvasinormală, fenomenele pulmonare reduse sau se observă o absenţă congenitală a canalelor deferente.

Mutaţiile noi sunt rare în bolile AR şi, de regulă, se poate presupune că ambii părinţi ai unui copil afectat sunt heterozigoţi. Totuşi, în 1% din cazurile de *atrofie musculară spinală* (SMA) tip I (boala Werdnig-Hoffman) copilul afectat moşteneşte o alelă de la unul dintre părinţi, care este heterozigot, iar cealaltă alelă provine printr-o mutaţie germinală nouă de la un părinte nepurtător; în aceste cazuri, riscul de recurenţă este foarte mic.

Aşa cum am precizat mai sus, heterogenitatea alelică este frecventă în bolile AR, dar şi *heterogenitatea de locus* se întâlneşte în unele afecţiuni AR. Multe dintre surdităţile congenitale sau formele de cecitate recesivă sunt produse de mutaţii în loci autozomali diferiţi.

Vom menţiona, în sfârşit, fenomenul de *disomie uniparentală* prin care un copil afectat poate moşteni ambele copii ale unui cromozom (cu alela mutantă) de la unul dintre părinţi, dar asupra acestui fenomen, rar dar interesant, vom reveni mai târziu.

2.4. Transmiterea legată de sex

Transmiterea legată de sex se referă la ereditatea genelor situate pe cromozomii sexuali. După cum ştim deja, cromozomii X şi Y au morfologie, gene, roluri şi distribuţie diferită la cele două sexe. Prima diferenţă majoră este reprezentată de dimensiunea şi numărul redus de gene[58] al cromozomului Y (aproape 2/3 din braţul lung al cromozomului Y fiind reprezentat de

58. Pe cromozomul Y au fost identificate până în prezent 48 de gene ce codifică proteine şi 44 de gene ARN.

heterocromatină formată din ADN înalt repetitiv, inactiv genetic). Marea majoritate a genelor sunt implicate în determinismul sau controlul unor caractere sexuale, specific masculine, şi nu au alele omoloage pe X. Numai o mică parte dintre genele cromozomului Y, situate mai ales în regiunile pseudo-autozomale[59], au alele omologe pe X şi pot realiza recombinări în cursul meiozei. Cromozomul X (cu peste 1.100 de gene) are gene de sexualizare, dar şi gene nesexuale. O a doua diferenţă majoră este reprezentată de faptul că genele de pe X se vor găsi la organismele feminine (XX) în doză dublă (homozigote sau heterozigote), în timp ce la bărbaţi (XY) vor fi în doză unică (hemizigot). Această diferenţă de dozaj este compensată (aproape complet) prin inactivarea unuia dintre cei doi cromozomi X de la femeie.

Ţinând cont de datele precizate sintetic mai sus, este logic să presupunem că există mai multe modele particulare de transmitere legată de sex:

- transmiterea caracterelor legate de Y;
- transmiterea caracterelor determinate de genele regiunilor pseudoautozomale;
- transmiterea caracterelor legate de X, recesivă sau dominantă.

a) Transmiterea legată de Y (holandrică)

Un caracter legat de Y se transmite de la tată, prin cromozomul Y, la toţi fiii săi. Se cunosc extrem de puţine caractere patologice „nesexuale" cu acest mod de transmitere (un exemplu posibil este o formă de *retinită pigmentară* care se transmite de la tată exclusiv la băieţi; OMIM % 400004). Mutaţiile genelor implicate în determinismul şi diferenţierea sexuală (dintre care cel mai bine cunoscute sunt mutaţiile genei *SRY*) produc o inversiune sexuală[60] şi/sau sterilitate (disgenezie gonadică completă 46,XY). În schimb, alelele polimorfice ale ADN din cromozomul Y se transmit după modul *holandric* precizat mai sus.

b) Transmiterea caracterelor determinate de gene din regiunile pseudoautozomale X şi Y

Pentru a recunoaşte un caracter determinat de o genă din această regiune, trebuie studiată ascendenţa şi descendenţa subiecţilor de sex masculin. Cei care au moştenit caracterul de la tatăl lor, prin intermediul cromozomului Y, îl vor transmite mai frecvent la fiii lor, în timp ce acei care l-au primit de la mama lor prin intermediul cromozomului X îl vor transmite preferenţial fetelor lor. Acest mod de ereditate a fost numită *ereditate parţial legată de sex.*

Până în prezent se cunosc trei afecţiuni produse prin mutaţii diferite ale genei pesudo-autozomale *SHOXY*, ce codifică un factor de transcripţie implicat în reglarea creşterii: *statura mică idiopatică familială* (OMIM # 300582), *discondrosteoza Leri-Weill* (OMIM # 127300) – o displazie scheletică cu statură mică, disproporţionată şi deformarea antebraţului şi displazia mezomelică Langer – hipoplazie severă a membrelor (antebraţe şi gambe).

c) Transmiterea legată de X

Pe cromozomul X au fost localizate peste 1.100 de gene dintre care circa 50% se asociază cu fenotipuri anormale. Ele au o distribuţie diferită la cele două sexe şi un mod de transmitere particular, uşor de identificat. Luând în discuţie o genă mutantă, situată pe X, sunt posibile cinci genotipuri: X^NY şi X^aY – la bărbat, X^NX^N, X^NX^a şi X^aX^a – la femeie. Mutaţia genei se exprimă la bărbat (hemizigot) indiferent dacă manifestarea ei fenotipică este dominantă sau recesivă. La femeile heterozigote X^NX^a, datorită fenomenului de inactivare întâmplătoare a cromozomului X, alela mutantă se exprimă în 50% din celule, indiferent dacă mutaţia produce un fenotip recesiv (cel mai frecvent) sau dominant (rar); deci distincţia fenotipică între transmiterea dominantă şi recesivă se estompează (prin „*hemizigoţie funcţională*") şi este arbitrară, condiţionată de proporţia femeilor heterozigote care manifestă boala şi severitatea ei. În plus, unele mutaţii legate de X se pot asocia cu inactivarea preferenţială a cromozomului X^a la femei, fenomen care poate atenua consecinţele fenotipice. De aceea, mulţi geneticieni nu mai clasifică bolile legate de X în: recesive legate de X şi dominante legate de X.

> Pentru a înţelege mai bine acest fenomen să luăm cazul unei gene localizate pe cromozomul X cu două alele, o alelă normală şi o alelă nulă datorită unei mutaţii ce introduce un codon stop precoce. Toţi bărbaţii ce au moştenit alela nulă vor avea un nivel de 0% pentru proteina corespunzătoare în 100% din celule. La femei, în 50% din celule, datorită inactivării cromozomului X ce poartă alela mutantă, nivelul proteinei va fi de 100% din nivelul normal, iar în restul de 50% de celule, datorită inactivării cromozomului X ce poartă alela normală, nivelul proteinei va fi de 0%. Astfel, fenotipul femeilor heterozigote pentru genele localizate pe cromozomul X nu depinde de interacţiunile ce se realizează între cele două alele (ca în cazul transmiterii dominante sau recesive autozomale) ci, mai degrabă, de relaţiile funcţionale ce se vor stabili între cele două populaţii

59. Regiunile pseudo-autozomale (PAR1 şi PAR2), situate la telomere, sunt relicve ale omologiei dintre X şi Y (care au origine filogenetică comună, evoluând dintr-o pereche de autozomi). Ele au gene omoloage (de exemplu SHOXX şi SHOXY.
60. Pacienţii cu disgenezia gonadică (DG) completă (cunoscută şi sub numele de DG pură XY sau sindromul Swyer) au fenotip şi OGE feminine, amenoree primară (gonadele fiind înlocuite prin bandelete fibroase), trompe şi uter.

Tabel 6.8. Transmiterea legată de X recesivă a unui caracter patologic

Genotipurile persoanelor sănătoase sunt X^NY, X^NX^N, X^NX^a, iar cele ale bolnavilor sunt X^aY, X^aX^a

Combinații genotipice parentale	Gameți	Descendenți	
		Genotipuri	Fenotipuri
1. $X^NY \times X^aX^N$	$(X^N + Y) \times (X^a + X^N)$	$¼\ X^aY$; $¼\ X^NY$, $¼\ X^aX^N$; $¼\ X^NX^N$	Un sfert dintre copii vor fi bolnavi (aceştia sunt ½ băieți), toate fetele vor fi sănătoase (½ purtătoare)
2. $X^aY \times X^NX^N$	$(X^a + Y) \times (X^N + X^N)$	X^NY ; X^aX^N	Toți copiii vor fi sănătoşi, dar toate fetele vor fi purtătoare
3. $X^aY \times X^aX^N$	$(X^a + Y) \times (X^a + X^N)$	$¼\ X^aY$; $¼\ X^NY$, $¼\ X^aX^a$; $¼\ X^aX^N$,	½ dintre băieți sunt bolnavi ½ dintre fete sunt bolnave, ½ dintre fete sunt purtătoare
4. $X^NY \times X^aX^a$	$(X^N + Y) \times (X^a + X^a)$	X^aY ; X^aX^N	Toți băieții sunt bolnavi, toate fetele sunt purtătoare
5. $X^aY \times X^aX^a$	$(X^a + Y) \times (X^a + X^a)$	X^aY ; X^aX^a	Toți copiii (băieți şi fete) sunt bolnavi
6. $X^NY \times X^NX^N$	$(X^N + Y) \times (X^N + X^N)$	X^NY ; X^NX^N	Toți copiii sunt sănătoşi

celulare la nivelul organismului (distribuția tisulară a celor două tipuri celulare şi rolul proteinei la nivelul țesutului respectiv).

Datorită acestor particularități ale speciei umane, fenotipurile genelor localizate pe cromozomul X realizează un continuu atât din punctul de vedere al penetranței, cât şi al expresivității (sau al severității bolii), variind de la o penetranță redusă la cele două sexe, asociată cu manifestarea bolii practic numai la bărbați (anemia prin deficiență de G6PD), până la o penetranță completă, asociată cu manifestări clinice la toate femeile purtătoare şi cu mortalitate embrionară sau fetală la sexul masculin (sindromul Rett fiind un exemplu elocvent). Între aceste două extreme se poziționează bolile cu penetranță incompletă pentru care manifestările clinice sunt prezente atât la bărbați, cât şi la femei, gravitatea bolii fiind însă redusă la acestea din urmă.

Considerăm însă că această împărțire este utilă deoarece *fenotipurile dominante se exprimă constant la heterozigote în timp ce, în mod obişnuit, fenotipurile recesive nu se manifestă.*

2.5. Transmiterea legată de X recesivă (XR)

Dintre bolile XR, cele mai cunoscute sunt *hemofilia, distrofia musculară Duchenne, cecitatea pentru culori, deficiența în G6PD* ş.a.

O mutație XR se manifestă fenotipic la bărbații hemizigoți X^aY (frecvent) şi la femeile homozigote X^aX^a (foarte rar); femeile sănătoase pot fi X^NX^N sau X^NX^a (purtătoare de genă mutantă sau conductoare). Cu cele cinci genotipuri sunt posibile următoarele combinații (tabelul 6.8), dar în funcție de boală, în practică, se întâlnesc numai o parte dintre acestea.

a) Criteriile transmiterii legate de X recesive

În bolile XR, de obicei, *bolnavi sunt numai bărbații*, care au primit alela mutantă de la femei sănătoase, dar purtătoare (combinația 1, tabelul 6.8). Deci *din părinți sănătoşi rezultă copii bolnavi* (1/4), dar aceştia vor fi *numai băieți* (½), care au primit gena anormală de la mamă; fetele vor fi sănătoase (½ purtătoare). În arborele genealogic (figura 6.30) se înregistrează o *transmitere oblică, în diagonală, şi discontinuă*, de la un bărbat bolnav (bunic, străbunic), prin femei sănătoase, dar purtătoare, la un băiat bolnav.

Dacă bolnavii au capacitate de reproducere (de exemplu, în hemofilie) şi se căsătoresc cu o femeie sănătoasă şi homozigotă (combinația 2), *nu pot transmite boala băieților* (transmiterea tată → fiu nu este deci posibilă) sau prin băieți la generațiile următoare. În schimb, toate fetele vor fi obligatoriu heterozigote, purtătoare.

În cazul unor mutații frecvente şi puțin severe ale unor gene de pe X, cum ar fi *deficiența în G6PD* (în populația afro-americană, 10% dintre bărbați au

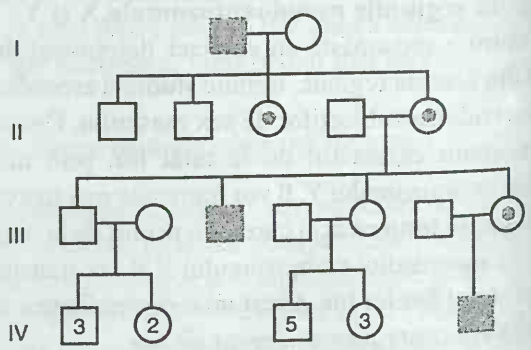


Figura 6.30. Arborele genealogic al unei boli legată de X recesivă (hemofilia A)

Boala este transmisă de la un bunic afectat, prin femei purtătoare la nepoți sau strănepoți

deficiență de G6PD, iar 18% dintre femei sunt heterozigote) sau *daltonismul* (8% dintre bărbați și 1:150 dintre femei), este posibil ca bolnavii (X^aY) să se căsătorească cu o femeie heterozigotă (combinația 3, tabelul 6.8)[61]; în descendența acestui cuplu pot apărea băieți bolnavi (½), dar și fete bolnave (½). În arborele genealogic (figura 6.31) se observă transmiterea tată → fiu, dar alela mutantă a băieților provine de la mamă. În aceleași afecțiuni sunt uneori posibile și combinațiile 4 și 5 din tabelul 6.8. Se observă faptul că o femeie bolnavă va transmite boala la toți băieții (situație caracteristică transmiterii XR), iar din doi părinți bolnavi rezultă numai copii bolnavi (situație sugestivă pentru transmiterea recesivă, în general).

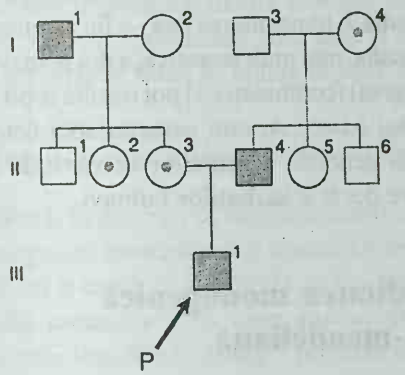


Figura 6.31. Arborele genealogic al unei familii cu deficiență în G6PD

(boală recesivă legată de X)

Se observă o transmitere tată (II4) → fiu (III-1), dar acesta primește gena mutantă de la mama sa, heterozigotă

În concluzie, criteriile majore pentru transmiterea XR sunt următoarele:

- bolnavii sunt aproape *exclusiv bărbați*, ei nu transmit niciodată boala;
- femeile heterozigote sunt, de obicei, neafectate și pot avea băieți bolnavi, indiferent de tipul de căsătorie;
- alela mutantă se transmite de la bărbați afectați la femei sănătoase și purtătoare, și de la acestea la ½ dintre băieți; există deci o discontinuitate în succesiunea generațiilor, doi părinți sănătoși (mama heterozigotă) putând avea copii bolnavi, dar numai băieți;
- nu este posibilă niciodată transmiterea tată → fiu, deoarece tatăl îi dă fiului cromozomul Y.

b) Mutații noi

Multe boli XR sunt severe și nu permit supraviețuirea până la vârsta reproducerii. *Distrofia musculară Duchenne* (DMD) este exemplul cel mai elocvent. Cu toate că alelele mutante se pierd din populație o dată cu bolnavul, prevalența bolii nu se modifică, deoarece alte cazuri apar prin mutații noi, din femei sănătoase și cert nepurtătoare. În DMD, circa 1/3 dintre cazuri apar din cupluri de părinți sănătoși, în care femeia nu este heterozigotă; în *hemofilie*, selecția este doar parțială și numărul de mutații noi este mult mai mic.

c) Femei afectate de boli legate de X recesive

Bolile legate de X recesive se manifestă aproape exclusiv la sexul masculin. Prezența certă a unei astfel de boli la o persoană de sex feminin are multiple explicații.

- Încrucișarea între un bolnav și o femeie purtătoare (combinația 3, tabelul 6.8); așa cum am spus, această eventualitate, rară, se întâlnește mai ales în bolile XR frecvente în anumite populații și care sunt mai puțin severe.
- Inactivarea „neechilibrată" a cromozomului X la femeile heterozigote X^a/X^N, care face ca în anumite regiuni ale corpului o proporție mai mare de celule să aibă activ X^a, fapt ce determină apariția *„în mozaic"* a unor semne de boală[62];
- Inactivarea „preferențială" a unui cromozom X anormal structural (izocromozom X sau translocație X-autozom); acest tip de inactivare reflectă mai probabil o selecție în favoarea celulelor care au X^N activ și deci nu există în realitate.
- Femei hemizigote pentru X datorită unei monosomii 45,X (sindromul Turner).
- Femei 46,XY în cadrul unor stări intersexuale (vezi capitolul 15.C).
- Mutație nouă (pe cromozomul X^N) la femei purtătoare X^a/X^N.
- Heterogenitate genetică.

d) Riscul genetic. Depistarea heterozigotelor pentru gene XR

Riscul de recurență a bolilor recesive legate de X depinde de genotipul părinților și sexul descendenților. Se poate calcula din tabelul 6.8, dar problema esențială este de a ști dacă o femeie sănătoasă din familia/fratria unui bolnav este sau nu purtătoare. Acest lucru (frecvent în practică pentru distrofia musculară Duchenne) se poate face pornind de la anamneza familială, pe baza faptului că femeile heterozigote sunt, datorită inactivării unuia dintre cromozomii X, un mozaic funcțional, cu celule în

61. Combinația $X^aY + X^aX^N$ este posibilă, cu o probabilitate de 1:5.000, și în cazul hemofiliei, dar se pare că hemofilia în stare heterozigotă este letală la femei.
62. Un exemplu edificator este *displazia ectodermală hipohidrotică/anhidrotică* (OMIM # 305100) transmisă RX, în care femeile heterozigote au regiuni ale pielii fără glande sudoripare (X^a – activ) și regiuni normale (X^N – activ).

care este activ X^N şi celule în care este activ X^a şi efectul primar sau secundar al genei mutante se poate identifica la nivel biochimic sau celular. O altă modalitate este analiza moleculară directă sau indirectă la nivelul ADN.

2.6. Transmiterea legată de X dominantă (XD)

Bolile XD sunt mult mai puţine decât cele XR şi, cu excepţia particulară a sindromului X fragil (vezi capitol 16.2.2), ele sunt foarte rare. Exemplul cel mai cunoscut este *rahitismul hipofosfatemic* (rezistent la vitamina D), în care se produce o eliminare crescută a fosfaţilor în urină (datorită unei tulburări de reabsorbţie renală), statură mică şi deformări osoase. Alte afecţiuni XD sunt: *condrodisplazia punctată, incontinentia pigmenti, sindromul Goltz, sindromul Rett* (despre care se pot obţine detalii prin accesarea *OMIM*).

Aşa cum am precizat, o boală legată de X este considerată dominantă dacă se exprimă *regulat* la femeile heterozigote (X^AX^n). La bărbaţi, nu se pune problema diferenţierii între un caracter dominant sau recesiv legat de X deoarece ei sunt hemizigoţi. Bărbaţii bolnavi (X^AY) vor prezenta însă *forme mai grave de boală* (uneori letală) deoarece la femeile afectate, în marea lor majoritate heterozigote (X^AX^n), inactivarea întâmplătoare face ca 50% dintre celule să aibă cromozomul X^n activ, fapt ce determină un fenotip mai puţin sever. În unele boli (de exemplu, *incontinentia pigmenti*[63] tipul 2, sindromul Rett ş.a.) manifestarea este aproape exclusivă la sexul feminin, deoarece boala este letală *in utero* la feţii X^AY.

Modelul de transmitere în bolile XD nu diferă esenţial de transmiterea AD deoarece femeile au o pereche de cromozomi X ca orice altă pereche de autozomi; apar, evident, o serie de particularităţi determinate de localizarea genei pe cromozomul X (tabelul 6.9) (figura 6.32).

Vom regăsi deci *continuitatea* bolii în succesiunea generaţiilor, determinată de faptul că orice bolnav are (cel puţin) un părinte bolnav. Fiecare copil al unei femei afectate şi heterozigote (X^AX^n) are un risc de 50% de a fi bolnav, indiferent de sex (combinaţia 1 din tabelul 6.9). *Părinţii sănătoşi vor avea copii sănătoşi* (combinaţia 6). Ceea ce este însă caracteristic transmiterii DX este faptul că *bărbaţii bolnavi (X^AY) vor avea toate fetele afectate şi toţi băieţii sănătoşi* (combinaţia 2; transmiterea tată → fiu este imposibilă), iar în situaţia, mai mult teoretică, a doi bolnavi (femeia heterozigotă) (combinaţia 3) pot rezulta copii sănătoşi, dar *numai băieţi*. Aceste caracteristici determină o frecvenţă generală a femeilor bolnave de două ori mai mare decât a bărbaţilor bolnavi.

3. Ereditatea monogenică non-mendeliană

Transmiterea caracterelor monogenice, prin modelele sale şi raporturile de segregare ale genelor alele, este, în general, concordantă cu principiile eredităţii mendeliane. Au fost totuşi semnalate o serie de excepţii care sunt determinate de mecanisme neobişnuite: mutaţii instabile, disomie uniparentală, amprentare genomică, mozaicism sau ereditate mitocondrială. Ele

Tabel 6.9. Transmiterea legată de X dominantă a unui caracter patologic

Genotipurile indivizilor sănătoşi sunt X^nY, X^nX^n, iar a celor bolnavi sunt X^AY, X^AX^n, X^AX^A

Combinaţii genotipice parentale	Gameţi	Descendenţi	
		Genotipuri	Fenotipuri
1. $X^NY \times X^aX^N$	$(X^N + Y) \times (X^a + X^N)$	$\frac{1}{4}X^aY$; $\frac{1}{4}X^NY$, $\underline{\frac{1}{4}X^aX^N}$; $\frac{1}{4}X^NX^N$	50% din băieţi vor fi afectaţi, 50% sănătoşi. Toate fetele vor fi sănătoase, dar 50% din ele vor fi purtătoare
2. $X^aY \times X^NX^N$	$(X^a + Y) \times (X^N)$	X^NY; $\underline{X^aX^N}$	Toţi copiii vor fi sănătoşi dar toate fetele vor fi purtătoare
3. $X^aY \times X^aX^N$	$(X^a + Y) \times (X^a + X^N)$	$\frac{1}{4}X^aY$; $\frac{1}{4}X^NY$, $\frac{1}{4}X^aX^a$; $\underline{\frac{1}{4}X^aX^N}$,	50% băieţi sunt bolnavi 50% fete sunt bolnave, 50% fete sunt purtătoare
4. $X^NY \times X^aX^a$	$(X^N + Y) \times (X^a)$	X^aY; $\underline{X^aX^N}$	Toţi băieţii bolnavi, toate fetele purtătoare
5. $X^aY \times X^aX^a$	$(X^a + Y) \times (X^a)$	X^aY; X^aX^a	Toţi copiii (băieţi şi fete) bolnavi
6. $X^NY \times X^NX^N$	$(X^N + Y) \times (X^N)$	X^NY; X^NX^N	Toţi copiii sănătoşi

63. Pacientele cu *incontinentia pigmenti* tipul 2 prezintă hiperpigmentări cutanate striate, în vârtejuri, absenţa dinţilor, căderea părului şi uneori tulburări neurologice sau microcefalie cu retard mental; supravieţuirea bolnavelor se corelează cu inactivarea preferenţială a X^A în marea majoritate a celulelor.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

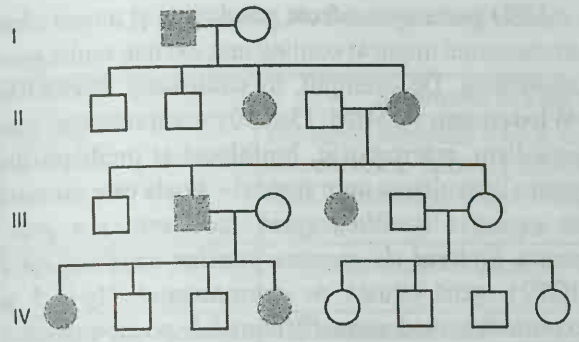


Figura 6.32. Arborele genealogic al unei familii cu o boală dominată legată de X

(rahitismul rezistent la vitamină D)

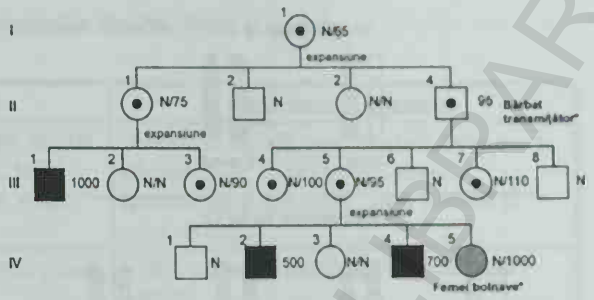


Figura 6.33. Transmiterea ereditară a sindromului X fragil

Se observă expansiunea repetițiilor trinucleotidice, transformarea premutațiilor în mutații și particularitățile transmiterii RX (bărbați transmițători și femei bolnave)

sunt discutate în detalii și în alte capitole, dar pentru o viziune unitară a problemei vom face și aici unele referiri, redundanța fiind, în opinia noastră, benefică.

3.1. Mutațiile instabile sau dinamice

Se consideră, în general, că alelele mutante ce produc boli monogenice mendeliene se transmit *nemodificate* de la părinți la copii. În anul 1991 au fost descoperite „*mutațiile dinamice*", în care *expansiunea* unor repetiții trinucleotidice instabile[64] prezente în anumite gene depășește un anumit *prag normal*, stabil, producând inactivarea genelor (vezi capitolul 7.B.1.4). Aceste mutații reprezintă un mecanism genetic nou pentru un grup important de boli, numite și *boli prin repetiții trinucleotidice*.

Până în prezent au fost descrise la om 16 boli ce au ca mecanism expansiunea unor trinucleotide/codoni (vezi capitolul 11.D), dintre care peste jumătate sunt produse prin creșterea numărului de repetiții ale codonului CAG (codifică glutamina – Q), motiv pentru care acestea sunt denumite boli poliglutaminice (boli poli-Q); în acest grup se includ: boala Huntington, atrofia musculară spinobulbară sau unele ataxii spinocerebeloase. Restul bolilor prin expansiuni trinucleotidice sunt produse prin repetiția altor codoni, motiv pentru care sunt denumite boli non-poli-glutaminice (boli non-poli-Q); dintre acestea menționăm: sindromul X fragil (expansiunea CGG), ataxia Friedreich (expansiunea GAA) sau distrofia miotonică (expansiunea CTG).

În populația generală, numărul de repetiții variază de la o persoană la alta; când numărul lor depășește o anumită limită, regiunea în care se găsesc devine *instabilă* și are tendința să *crească* în lungime (*premutație*), atunci când este transmisă la descendenți.

Expansiunea neobișnuită a repetițiilor transformă premutația în *mutație completă* și duce la apariția manifestărilor clinice ale bolii (figura 6.33). Astfel, în gena *FMR1* sunt tolerate între 6-53 repetiții ale codonului CGG, depășirea acestui prag produce, în intervalul 55-200, o premutație (pacientul este încă normal), iar peste 200 de repetiții o mutație completă, pacientul fiind afectat de sindromul X fragil. În gena *HTT* sunt tolerate între 10-35 repetiții ale tripletului CAG, pacientul fiind neafectat, depășirea acestui număr este patogenică, ducând la boala Huntington (36-40 repetiții – mutație cu penetranță redusă și pacient sănătos sau afectat; peste 40 de repetiții – mutație cu penetranță completă și pacient afectat. Deoarece vârsta de debut și severitatea bolii sunt direct proporționale cu mărimea expansiunii, acest mecanism explică fenomenul de *anticipație clinică* observat în acest grup de boli, unde în aceiași familie vârsta debutului clinic scade în generații succesive. În unele afecțiuni, *gravitatea bolii depinde de sexul părintelui* ce transmite gena mutantă; astfel transmiterea maternă pentru distrofia miotonică și sindromul X fragil sau paternă pentru boala Huntington – produce forme mai severe de boală.

3.2. Disomia uniparentală

Un alt mecanism neobișnuit implicat în producerea bolilor genetice este disomia uniparentală („*uniparental disomy*" – UPD[65]), în care o persoană primește ambele copii ale unui anumit cromozom sau a unei părți dintr-un cromozom numai de la unul din părinți (figura 6.34). Pe baza analizei moleculare se pot deosebi două subtipuri de UPD: *heterodisomie* – atunci când se moștenesc ambii cromozomi omologi numai de la unul dintre părinți (cei doi

64. Repetițiile trinucleotidice alcătuiesc un grup de *microsateliți* instabili.
65. Vom folosi prescurtarea UPD, derivată din termenii din limba engleză, în loc de DUP (de la *disomie uniparentală*) pentru a evita confuzia cu prescurtarea „dup" utilizată pentru desemnarea unei duplicații cromozomiale.

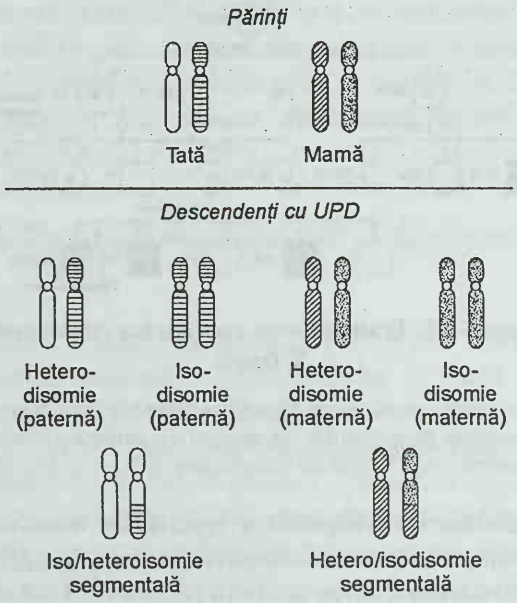


Figura 6.34. Tipuri de disomie uniparentală: heterodisomie, isodisomie, disomie segmentală

cromozomi vor fi diferiți); *isodisomie* – atunci când se moștenesc două copii ale aceluiași cromozom (cei doi cromozomi sunt identici).

După dimensiunea secvențelor implicate s-au descris trei tipuri de UPD:

- *UPD pentru întregul complement cromozomial* (diploidie uniparentală) paternă sau maternă; în UPDpat toți cei 46 de cromozomi sunt de origine paternă (și produc *mola hidatiformă completă* sau, în caz de triploidie, mola hidatiformă parțială); în UPDmat efectele sun minime producându-se numai ovare chistice;
- *UPD pentru un cromozom complet și intact* (ambii omologi provin de la un părinte); cel mai frecvent rezultă prin „salvarea unei trisomii" (zigotul trisomic pierde postmitotic unul din cei trei cromozomi);
- *UPD segmentală*, când numai un segment cromozomial provine de la unul dintre părinți, datorită unei recombinări somatice postzigotice între omologul matern și patern.

UPD nu are consecințe clinice prin ea însăși, ci prin faptul că izodisomia poate realiza o stare de *homozigoție a unei gene recesive* ce există sub formă heterozigotă numai la unul dintre părinți. S-au descris cazuri de *fibroză chistică* în care ambele gene mutante provin de la două copii identice ale cromozomului 7 matern. De asemenea, au fost semnalate cazuri de *hemofilie A*, în care ambii cromozomi X și Y ai unui băiat bolnav provin de la tatăl afectat sau boala se manifestă la o fată homozigotă (prin izodisomia X^a) născută din părinți X^aX^N și X^NY.

UPD poate avea efecte patologice și atunci când cromozomul implicat conține una sau mai multe *gene amprentate*. De exemplu, în **sindromul Beckwith-Wiedemann** (OMIM 130650) – caracterizat prin gigantism, macroglosie, omfalocel și predispoziție pentru dezvoltarea unor tumori – boala este asociată cu *expresia bialelică* (prin izodisomie) a genei pentru *factorul de creștere similar insulinei tip 2* (IGF2), genă situată pe cromozomul 11p15.5 și exprimată în mod normal[66] numai de pe cromozomul patern (bolnavul are ambii cromozomi 11 de la tată).

UPD a fost considerată inițial ca „o raritate interesantă", dar până în prezent au fost descrise peste 1.100 de cazuri de UPD (pentru 19 din cele 23 de perechi de cromozomi) și estimări recente consideră că UPD se întâlnește la circa 1:3.500 nou-născuți. Se consideră că identificarea UPD (prin tehnici moleculare de CGH array), mai ales forma segmentală din unele aberații structurale ale cromozomilor va avea importanță pentru un diagnostic corect și chiar, în unele cazuri, pentru prognostic.

3.3. Amprentarea parentală (genomică)

În transmiterea mendeliană se pleacă de la premisa că *expresia genei este independentă de originea* sa maternă sau paternă; când se formează un zigot, genele „*par a uita*" originea lor parentală. În mod obișnuit, o alelă mutantă a unei gene autozomale este transmisă cu o *probabilitate egală* de la unul dintre părinți, indiferent de sex, la un copil de un sex sau altul. Există însă situații rare în care expresia unei gene mutante și deci a bolii este *diferită în funcție de originea ei*, maternă sau paternă. Această diferență de expresie între alela moștenită de la tată și alela moștenită de la mamă este produsă prin **amprentare parentală** sau **genomică** (vezi capitolul 4.D.1.2). Amprentarea este o formă de inactivare a genei ce produce o *expresie monoalelică*, dar *nu este o mutație*, deoarece este reversibilă.

Amprentarea se produce în gametogeneză, înainte de fecundare, marcând originea maternă sau paternă a anumitor gene. După concepție, expresia genei amprentate este suprimată în anumite țesuturi și se menține ca atare toată viața; excepție fac celulele germinale în care se produce o conversie a amprentării în funcție de sex: la bărbat, alelele moștenite de la mamă, cu amprentare maternă, vor fi convertite în gametogeneză și vor fi trecute descendenților cu amprentare paternă.

Amprentarea este un mecanism normal de reglare epigenetică care nu produce, prin el însuși, o boală

66. Alela maternă este represată , prin metilarea ADN.

Tabel 6.10. Fenotipurile și cauzele sindroamelor Prader-Willi și Angelman

	Sindromul Prader-Willi	Sindromul Angelman
Fenotip	Hipotonie neonatală severă, dismorfie facială caracteristică, mâini și picioare mici, talie mică, obezitate cu debut în copilărie, retard mental, tulburări de comportament	Dismorfie facială caracteristică, talie mică, microcefalie, retard mental sever, spasticitate și convulsii, lipsa vorbirii și crize de râs.
Deleție 15q11-13	~70% cazuri cu deleție pe cromozomul patern	~70% cazuri cu deleție pe cromozomul matern
Disomie uniparentală	~30% cazuri maternă	~3-5 % cazuri paternă
Gene incriminate	*SNRPN și necdina*, ambele cu expresie de pe cromozomul patern	*UBE3A* care este exprimată exclusiv matern, la nivel cerebral
Mutație genică	Neidentificată	7-9% cazuri
Mutație în centrul de amprentare	1-2% cazuri	7-9% cazuri
Alte cauze	Neidentificate	10-20% cazuri

ereditară, dar poate explica penetranța incompletă sau expresivitatea variabilă a unei afecțiuni monogenice. De exemplu, *tumora de glomus carotidian*, transmisă AD, la care subiecții purtători de genă mutantă sunt bolnavi sau sănătoși după cum ei au primit gena de la tată sau de la mamă; deci gena mutantă este *activă* dacă o transmite tatăl sau *inactivă* dacă provine de la mamă.

Amprentarea genomică implică circa 80 de gene, unele cu rol în controlul creșterii și dezvoltării embrionului și placentei, iar altele cu rol în dezvoltarea postnatală, boli genetice și cancer. Sunt cunoscute mai multe regiuni cromozomiale ce conțin gene amprentate situate pe: *7q matern, 11p patern, 14q matern, 15q matern, 15q patern* etc. Cel mai studiat exemplu (vezi capitolul 4.D.1.3) îl reprezintă sindroamele *Prader-Willi* (SPW) și *Angelman* (SA) produse, în mod obișnuit (dar nu exclusiv; vezi tabelul 6.10), de aceeași deleție a cromozomului 15q11-13, dar pe cromozomul de origine paternă (SPW) sau maternă (SA).

3.4. Mozaicismul

Mozaicismul este definit ca fiind prezența la un individ a cel puțin două linii celulare diferite genetic, dar derivate dintr-un singur zigot (prin aceasta se deosebește de himeră, formată prin unirea a doi zigoți ce vor forma un singur embrion; vezi capitolul 6.C.3).

Mozaicismul prezintă următoarele caracteristici:

- poate implica un cromozom întreg (aneuploidie) sau o singură genă (mutație);
- este un *eveniment postzigotic* care se produce într-o singură celulă;
- o dată ce modificarea genetică a fost generată și nu este letală, ea va fi transmisă celulelor-fiice, formându-se o *clonă* celulară anormală;
- procesul se poate produce în perioade diferite ale dezvoltării ontogenetice: în stadiul embrionar, în viața fetală sau postnatal; *momentul de producere* va determina *proporția* relativă a celor două clone și prin aceasta *severitatea* modificărilor fenotipice cauzate de clona anormală.

Nu vom discuta mozaicismul cromozomial, produs de o eroare postzigotică în mitoză, și nici nu vom mai insista asupra mozaicismului funcțional care se întâlnește la femei, prin inactivarea unuia dintre cei doi cromozomi X. Ne vom referi doar la mutațiile genice produse în celulele somatice, care pot produce un *fenotip segmental* sau neuniform (în „pete"). **Mozaicismul somatic** este o cauză majoră a multor forme de cancer (vezi capitolul 18), dar a fost semnalat și în unele boli monogenice „clasice", ca de exemplu *neurofibromatoza 1 segmentală* (ce afectează un pacient, fără antecedente familiale de NF1, numai într-o anumite regiune a corpului), în unele boli legate de X (hemofilia A, distrofia musculară Duchenne, deficiența de ornitin transcarbamilază) sau în unele tulburări de morfogeneză.

Există și un **mozaicism germinal** sau **gonadic** care explică transmiterea unei boli genetice la mai mulți copii de către părinți normali (figura 6.22.D). Mutația se produce în perioada precoce a dezvoltării embrionare (este deci o mutație somatică) în celulele precursoare ale gameților, care efectuează un număr de diviziuni mitotice (câteva sute la embrionul masculin), ceea ce face ca o anumită proporție de gameți să posede mutația. Considerat foarte rar, acest mecanism începe să fie probat prin analizele moleculare: de exemplu, a fost demonstrat în 6% din cazurile de copii cu *osteogenesis imperfecta*, născuți din părinți sănătoși (figura 6.35), precum și în alte boli: neurofibromatoză sau unele boli recesive legate de X (de exemplu, 15%

BCU IAȘI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

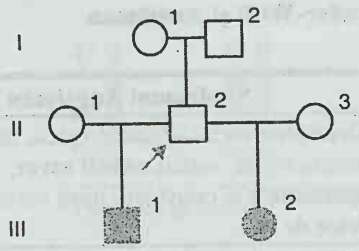


Figura 6.35. Arborele genealogic ce demonstrează recurența unei boli AD prin mozaicism germinal

Ambii copii afectați au *osteogenesis imperfecta* produsă prin aceiași mutație punctiformă; tatăl este sănătos și nu are mutația

din mamele nepurtătoare – X^NX^N – ale copiilor cu distrofie musculară Duchenne sau în unele cazuri de hemofilie A). Posibilitatea mutațiilor germinale face dificilă excluderea completă a riscului de recurență în boli recesive legate de X, la care testele de identificare a stării de purtător la mamă sunt normale, sau în bolile autozomal dominante în care părinții sunt clinic și genetic neafectați, dar din fericire acest risc este mic (3-4%). Amploarea mozaicismului gonadal nu a fost încă evaluată, dar pare a fi un fenomen mai frecvent decât se estima; astfel, recent s-a demonstrat că o treime dintre bărbații infertili cu cariotip normal au un *micromozaicism gonadal* pentru cromozomii sexuali; proporția lor crește cu vârsta bărbatului.

3.5. Transmiterea pe linie maternă

În capitolul 3.C.4 am prezentat structura ADN mitocondrial și am precizat că acesta poate suferi mutații producând o serie de boli degenerative, care sunt *transmise într-un mod specific, de la mamă la toți descendenții; bărbații bolnavi nu transmit boala* (figura 6.36) Explicația acestui mod particular de transmitere, pe linie maternă, este reprezentată de faptul că numai ovulul va furniza zigotului citoplasmă și mitocondrii. Bolile produse de mutații în ADNmt vor fi amplu prezentate în capitolul 12.

4. Ereditatea oligogenică

Ereditatea oligogenică este un fenomen descris recent în patologia genetică umană, ce reprezintă „o punte" de legătură între fenotipurile monogenice și poligenice, care estompează granițele nete stabilite între bolile considerate clasic monogenice și bolile multifactoriale.

Primele elemente demonstrând existența unei *interacțiuni multigenice* în manifestările unui fenotip/boală au provenit din studiile expresivității variabile a bolilor monogenice dominante care au evidențiat variații intra- și interfamiliale în manifestarea unei

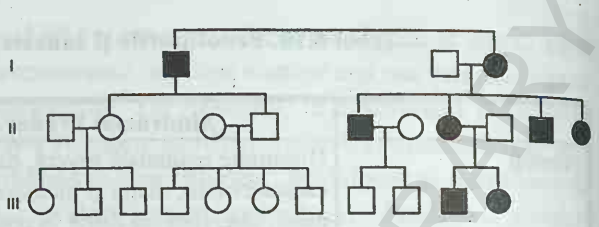


Figura 6.36. Transmiterea pe linie maternă a unei boli mitocondriale

boli produsă de o alelă mutantă dominantă sau de o pereche de alele recesive (vezi subcapitolul 6.D.2.2.c). Intervenția posibilă a unor factori modulatori de mediu nu poate însă explica gama largă a expresivității variabile. Alte ipoteze ce au fost invocate pentru a explica variațiile de expresie sunt: heterogenitatea alelică sau de locus, fenomenul de epistazie și existența unor gene modificatoare (care au și fost identificate recent prin studii moleculare/genomice) (vezi caseta 6.5).

Ulterior au fost identificate unele forme de boli considerate monogenice în care analizele moleculare au evidențiat două tipuri particulare de transmitere: *ereditatea digenică* și *ereditatea trialelică*.

- **Ereditatea digenică** se caracterizează prin faptul că boala este produsă de o alelă mutantă în fiecare dintre cele două gene implicate. De exemplu, într-o formă de *retinită pigmentară* bolnavii aveau o mutație în gena *ROM1* (de pe cromozomul 11q13) și o mutație în gena *RDS* (de pe cromozomul 6p21); genotipul lor era *ROM N/m; RDS N/m*. Indivizii heterozigoți numai pentru una dintre aceste mutații (*ROM N/m;RDS N/N* sau *ROM N/N; RDS N/***m**) nu erau afectați. În unele familii modul de transmitere a acestui tip de retinită pigmentară semăna cu modelul dominant autozomal (transmitere verticală, bărbați și femei afectate), dar părintele afectat transmitea boala numai la 25% din descendenți. În alte familii transmiterea se asemănă cu o boală recesivă deoarece doi părinți sănătoși, dar heterozigoți (*ROM N/m; RDS N/N și ROM N/N; RDS N/m*) pentru cele două tipuri de mutații au 25% descendenți afectați (figura 6.37)
- **Ereditatea trialelică** este o formă mai complexă de ereditate digenică în care, pentru producerea unui fenotip anormal, sunt necesare trei mutații. A fost descrisă în *sindromul Bardet-Biedl*, o boală genetică heterogenă produsă prin mutația a una sau două gene diferite dintr-un grup de cel puțin 12 gene (OMIM # 209900). În formele digenice (mutații în genele *BBS2* și BBS6) boala apare numai când o persoană are trei alele mutante (genotipul *BBS6 N/m; BBS2 m/m*) (figura 6.38).

Toate aceste observații au impus conceptul de **ereditate oligogenică** pentru *un efect fenotipic*

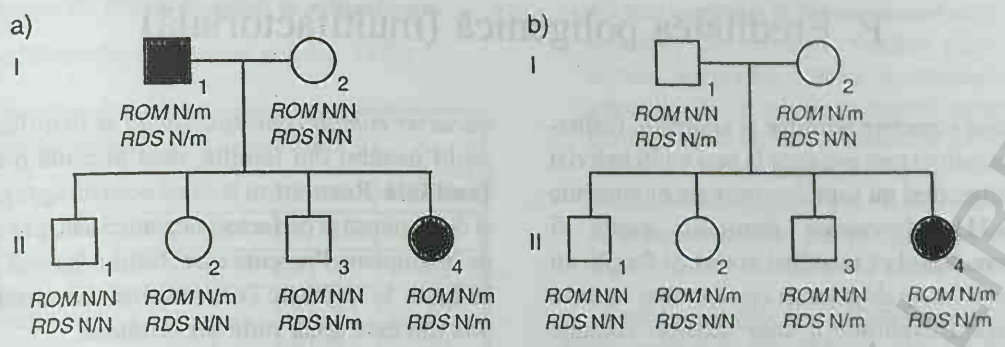


Figura 6.37. Ereditatea digenică a unei forme de retinită pigmentară

a) Arbore genealogic cu un „model autozomal dominant"; b) Arbore genealogic cu un „model autozomal recesiv"

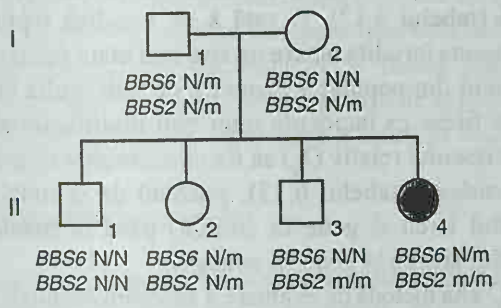


Figura 6.38. Ereditatea digenică și trialelică a unei forme de sindrom Bardet-Biedl

(caracter fizic sau predispoziție la boală) produs de două sau câteva (puține) gene ce lucrează împreună. În acest context, multe dintre bolile monogenice ar trebui considerate oligogenice. În această categorie ar trebui incluse foarte probabil toate *interacțiunile epistatice* între alele unor loci diferiți, în care efectul unei gene este modulat de acțiunea uneia sau a câtorva gene modificatoare ce determină variații în penetranță și expresivitate. Rațiunea principală pentru care ele sunt considerate încă monogenice și deci mendeliene ar fi că majoritatea fenotipurilor pot fi atribuite mutațiilor unui singur locus.

La granița dintre ereditate, monogenică și poligenică/multifactorială se constituie un grup din ce în ce mai numeros de **boli oligogenice** dintre care citâm: unele forme de hemocromatoză, deficiența izolată de hormon de eliberare a gonadotropinelor (GnRH), nefroza congenitală finlandeză, nefronoftiziile, boala Hirschprung, sindromul Usher precum și unele forme de diabet zaharat tip II.

Problema esențială este mecanismul molecular al bolilor oligogenice, care începe să fie treptat elucidat. Deoarece mutațiile în doi loci diferiți și variantele alelice implicate influențează în ultimă instanță expresia, funcția și/sau interacțiunile proteinelor, elucidarea patogeniei acestor boli va implica interacțiunile proteină-proteină ce formează anumite căi (module funcționale) sau complexe moleculare în celulă, cu o anumită localizare spațială sau specificitate biochimică. Aceste module, alcătuite din mai multe tipuri diferite de molecule, au o anumită funcție ce rezultă din interacțiunile precis reglate ale componentelor lor. Prin alterarea a două sau mai multe componente ale unui anumit modul se produc boli diferite, care au frecvent manifestări comune.

Există două modele principale care explică producerea bolilor oligogenice: *modelul dozajului* – scăderea concomitentă a dozajului celor două proteine diferite ce interacționează pentru a produce boala) și *modelul degradării* – o proteină mutantă nu mai interacționează cu altă proteină mutantă făcând imposibilă realizarea unui complex proteic funcțional.

Cel mai bun exemplu cunoscut până în prezent este al **bolilor ciliare** în care se produc mutații diferite ce afectează componente diverse ale aceluiași modul, cilul primar. Toate ciliopatiile (rinichiul polichistic, nefronoftiziile sau sindroamele Bardet-Biedl, Meckel-Gruber, Jubert, Alstrom, Usher) au unele elemente fenotipice comune: chisti renali, retinită pigmentară, obezitate, polidactilie etc.

Cert este că *biologia modulelor sau rețelelor* (funcționale sau reglatorii) va permite înțelegerea profundă a mecanismelor bolilor umane, dezvoltarea unor markeri performanți de diagnostic și pronostic al bolilor și a unor noi tipuri de medicamente. Probabil că *„medicina sistemelor va fi viitorul medicinii genomice și îngrijirilor medicale"* (Auffray, 2009).

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

E. Ereditatea poligenică (multifactorială)

Numeroase caractere normale şi anormale (calitative sau cantitative) sunt prezente la mai mulţi indivizi dintr-o familie, deşi nu sunt determinate monogenic (tabelul 6.11). *Agregarea familială* poate fi explicată prin faptul că membrii aceleiaşi familii au *un număr mai mare de gene în comun*. Dar aceasta nu este singura explicaţie a unor trăsături comune într-o familie. Nu trebuie uitat că membrii unei familii trăiesc în aceleaşi condiţii de mediu socioeconomic şi cultural şi nici de posibilitatea ca, uneori, o aceeaşi boală să apară din întâmplare la mai multe persoane din aceeaşi familie. Totuşi, majoritatea caracterelor familiale non-mendeliene sunt determinate de acţiunea combinată a unor factori genetici, reprezentaţi de mai multe gene nealele (poligenie), şi a unor factori de mediu. Deci *ereditatea lor este complexă, multifactorială*.

Atunci când un caracter normal sau mai ales o boală se găseşte la mai mulţi membri ai unei familii specialiştii în epidemiologie genetică trebuie să stabilească dacă această agregare familială este determinată de factori genetici, să evalueze contribuţia lor şi, în final, să identifice genele implicate în aceste boli multifactoriale.

1. Stabilirea naturii genetice a unui caracter familial non-mendelian

Stabilirea naturii genetice a unui caracter familial non-mendelian, care ar putea fi un caracter multifactorial, se realizează prin trei metode esenţiale: determinarea şi măsurarea agregării familiale, studiul gemenilor şi studiile de adopţie.

1.1. Măsurarea agregării familiale

Cea mai directă metodă pentru evidenţierea unui determinism genetic este să stabilim că un anumit *caracter complex/multifactorial* se manifestă la mai mulţi membri din familie, deci prezintă o **agregare familială**. Reamintim însă că această agregare poate fi determinată şi de factori negenetici sau, pur şi simplu, de întâmplare. Prezenţa caracterului la două persoane înrudite se numeşte *concordanţă*, iar absenţa lui la una din cele două rude *discordanţă*.

Gradul de agregare familială poate fi măsurat prin **rata riscului relativ** (λ_r) sau raportul dintre prevalenţa bolii la rudele unei persoane afectate (proband) şi prevalenţa bolii în populaţia generală. Cu cât λ_r este mai mare, cu atât agregarea familială este mai pronunţată (tabelul 6.12). O rată $\lambda_r = 1$ indică faptul că persoana înrudită nu are un risc mai mare decât orice individ din populaţia generală de a dezvolta boala. Este firesc ca incidenţa unei boli multifactoriale şi rata riscului relativ (λ_r) să fie *concordante cu gradul de rudenie* (tabelul 6.13), scăzând de la rudele de gradul I (cu ½ gene în comun) până la rudele de gradul III (cu ⅛ gene în comun).

O altă metodă de evaluare a agregării familiale este reprezentată de **studiile caz-control**, în care pacienţii cu boală (*cazurile*) sunt comparaţi (istoric familial,

Tabelul 6.12. Rata de risc relativ (λ_r) pentru rudele probanzilor cu unele boli familiale şi ereditate multifactorială

(adaptat după Nussbaum *et al.*, 2001)

Boala	Gradul de înrudire	λ_r
Autism	Gemeni monozigoţi	2.000
	Fraţi	150
Diabet zaharat tip I	Gemeni monozigoţi	80
	Fraţi	12
Psihoză maniaco-depresivă	Gemeni monozigoţi	60
	Fraţi	7
Schizofrenie	Gemeni monozigoţi	48
	Fraţi	12

Tabelul 6.11. Caractere multifactoriale normale şi anormale

Caractere normale	Caractere anormale
– culoarea pielii şi a părului	– despicăturile labio-palatine
– culoarea ochilor	– defectele de tub neural
– înălţimea	– malformaţiile congenitale de cord
– dermatoglifele	– luxaţia congenitală de şold
– coeficientul de inteligenţă	– schizofrenia
– habitusul	– boala coronariană
– fizionomia feţei	– diabetul zaharat
– personalitatea individului	– cancerul de sân, cancerul de colon etc.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 6.13. Riscul familial în schizofrenie

(modificat după Strachan și Read, 1999)

Grad de rudenie	Incidență	λ_R
Copii	12,31 %	15,4
Fratrie	8,51 %	10,6
Nepoți, nepoate	2,81 %	3,5
Veri primari	2,91 %	3,6
Unchi, mătuși	2,01 %	2,5

expuneri la factori de mediu, ocupație, poziție geografică, paritate etc.) cu indivizi fără boală (*control*) (de exemplu, soțiile ce trăiesc în același mediu). Pentru a determina o posibilă contribuție genetică la agregarea familială a bolii, se compară frecvența bolii în familia cazului cu frecvența ei la rudele lotului-control. Studiile caz-control sunt dificile și pasibile la erori de recenzare, de alegere a loturilor etc.

1.2. Studiul gemenilor

Pentru evaluarea rolului eredității și mediului la om, gemenii sunt subiecți ideali, adevărate „*experimente naturale*".

Gemenii monozigoți (MZ) provin prin clivajul timpuriu în embriogeneză (în primele 14 zile după concepție[67]) a unui singur zigot. Ei vor avea întotdeauna același sex și vor fi identici din punct de vedere genetic, exceptând posibilele mutații somatice postzigotice (mai frecvente în dezvoltarea celulelor sistemului imun), numărul moleculelor de ADN mitocondrial sau modelul de inactivare a cromozomului X (dacă sunt de sex feminin). **Gemenii dizigoți** (DZ) se dezvoltă din două ovule diferite, fiecare dintre ele fertilizate de către un spermatozoid; au același sex sau sexe diferite (în proporții egale) și, din punct de vedere genetic, sunt la fel ca și frații obișnuiți, având numai jumătate din alelele lor identice (de aceea se mai numesc și *gemeni fraterni*). Frecvența nașterilor gemelare variază între 0,5 și 2%. În general se apreciază că 1/3 dintre toți gemenii sunt MZ, iar 2/3 sunt DZ, din care 1/2 sunt de același sex, iar 1/2 sunt de sex diferit.

Diagnosticul gemelarității, necesar numai pentru gemenii de același sex, necesită evaluarea atentă a multor caracteristici: aspectul placentei, numărul membranelor amniotice și corionice, morfologia corpului, dermatoglifele, markerii serologici și, cel mai sigur, markerii ADN, polimorfici. Toți gemenii dizigoți au doi saci amniotici și doi saci corionici (ei pot fuziona secundar, dar circulația fiecărei părți a placentei rămâne separată). Natura membranelor fetale la gemenii MZ depinde de momentul separării. La 75% din MZ există un singur amnios și un singur corion; restul de 25% au două membrane corionice și nu pot fi deosebiți de gemenii DZ. În acest caz diagnosticul de gemelaritate este pus pe baza unor markeri serologici și ADN identici (MZ) sau diferiți (DZ).

Gemenii dizigoți (DZ) permit măsurarea concordanței bolilor la doi indivizi înrudiți care cresc și *trăiesc în același mediu*, dar care sunt diferiți din punct de vedere genetic, proporția de gene comune fiind de 50%. Gemenii monozigoți (MZ) au *genotip identic* și pot crește și trăi împreună sau separați. Dacă vor trăi în condiții de mediu diferite, acestea vor fi responsabile de diferențele observate în apariția bolilor în cursul vieții lor.

Studiile gemenilor sunt adesea folosite pentru a deosebi caracterele multifactoriale de cele monogenice sau de cele cauzate de factori negenetici.

- *Gemenii MZ, cu genotipuri identice, vor fi 100% concordanți* pentru transmiterea bolilor monogenice. Gemenii dizigoți vor avea o concordanță de 50% pentru trăsăturile dominante monogenice și de 25% pentru cele recesive.
- O concordanță *sub 100% la gemenii MZ* este o dovadă clară că *factorii negenetici au un rol în producerea bolii* și că avem de-a face mai degrabă cu un caracter multifactorial.
- *Cu cât procentul de concordanță la MZ este mai mare decât la DZ, cu atât bolile multifactoriale au o componentă genetică mai pronunțată* (tabelul 6.14).

Limitele studiilor gemenilor. Studiul gemenilor a adus puține contribuții majore în genetica umană. Există însă nu numai limite numerice (puține cupluri disponibile), ci și științifice. Astfel, gemenii MZ nu au exact aceeași expresie a genelor, cu toate că ei au genotipul identic: de exemplu, inactivarea întâmplătoare a cromozomilor X, după clivarea unui zigot în doi gemeni monozigoți feminini, produce diferențe semnificative în expresia alelelor genelor de pe cromozomul X, în diferite țesuturi. Apoi, expunerea la factorii de mediu nu este întotdeauna identică pentru gemeni, mai ales la vârsta de adult, odată cu părăsirea căminului copilăriei. Mai mult, chiar și intrauterin, mediul nu este absolut identic, putând determina modificări epigenetice diferite.

67. O diviziune apărută foarte târziu, după a 14-a zi de la concepție poate da naștere la gemeni uniți (care apar cu o frecvență de 1/50.000 de sarcini) cum sunt *siamezii*, numiți astfel în memoria celebrilor Chang și Eng, născuți în 1811 în Thailanda (*Siam*) și uniți prin abdomenul comun.

Tabel 6.14. Concordanța unor trăsături între gemenii monozigoți și dizigoți

(după Emery și Rimoin, 1997)

Caracter	Procentul de concordanță (prezența boli la ambii gemeni)	
	Gemeni monozigoți	Gemeni dizigoți
Diabet zaharat tip 1 insulino-independent	100	10
Înălțimea	95	52
Numărul crestelor digitale	95	49
Coeficientul de inteligență (IQ)	90	60
Psoriazis	72	15
Epilepsia idiopatică	70	6
Psihoza maniaco-depresivă	67	5
Retard mintal cu IQ < 50	60	3
Schizofrenia	53	15
Diabet zaharat tip 1 insulino-dependent	50	5
Astmul bronșic	47	24
Luxația congenitală de șold	40	3
Despicătura labio-palatină	38	8
Artrita reumatoidă	34	7
Piciorul strâmb congenital	33	3
Hipertensiunea arterială	25	7
Stenoza pilorică	15	2
Cancerul cu aceeași localizare	7	3
Spina bifida	6	3

1.3. Studiile de adopție

Studiul copiilor adoptați este probabil *cea mai bună metodă* pentru estimarea contribuției factorilor genetici în determinismul bolilor multifactoriale. Studiul constă în compararea ratei unor îmbolnăviri la copiii adoptați ai unor părinți afectați cu rata de îmbolnăvire a unor copii adoptați ai unor părinți neafectați. De exemplu, copiii adoptați ai unor părinți schizofrenici fac și ei boala în proporție de 8-10%, în timp ce copiii adoptați ai unor părinți neafectați dezvoltă boala numai în proporție de 1%, la fel ca și în populația generală Dificultățile studiilor de adopție sunt reprezentate de lipsa frecventă a informațiilor despre familia biologică, combinată cu plasamentul selectiv al copiilor adoptați.

De subliniat că atât studiul gemenilor, cât și studiul adopțiilor sunt metode limitate care nu pot, prin ele însele, aduce argumente decisive în ceea ce privește rolul genelor în determinismul trăsăturilor multifactoriale și nici nu pot identifica genele specifice ale bolii. Aceste studii servesc numai ca indicii preliminare privind rolul componentelor genetice în producerea bolii.

1.4. Heritabilitatea

O idee fundamentală în genetica caracterelor complexe este că variabilitatea interindividuală a unui caracter fenotipic poate fi determinată de variabilitatea genetică și de variabilitatea negenetică: $V_F = V_G + V_M$.

Pentru a măsura *cota de participare a eredității* la determinarea variabilității unui caracter s-a introdus conceptul teoretic de **heritabilitate**[68] (simbolizată prin h^2) definită ca fiind *proporția* din variația fenotipică (V_F) totală a unui caracter complex produsă de gene (alele diferite, în loci diferiți) deci de variația genotipică (V_G): $h^2=V_G/V_F$. Heritabilitatea se determină prin corelația dintre măsurătorile unui caracter cantitativ/prezența unei boli printre rude cu un grad cunoscut de înrudire (părinți – copii, frate – frate, gemeni MZ și DZ) sau raportul dintre incidența bolii la rudele de gradul întâi al unui bolnav și incidența bolii la rudele de gradul întâi ale unei persoane sănătoase.

În studiile pe gemeni se determină prin calcularea ratelor de concordanță la gemenii MZ și DZ după formula:

$$h^2 = \frac{\text{concordanța la MZ} - \text{concordanța la DZ}}{1 - \text{concordanța la DZ}}$$

68. Termenul de „heritabilitate" derivă de la cuvântul din limba engleză „*heritability*" care este practic intraductibil; în limba franceză pentru același cuvânt se folosește termenul „*l'héritabilité*".

BCU CLUJ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 6.15. Estimarea heritabilității în diferite boli

(adaptat după Nussbaum *et al.*, 2001)

Boală	Frecvență %	Heritabilitate
Schizofrenie	1,0	85
Astm bronșic	4,0	80
Despicături labiale±palatine	0,1	76
Stenoză pilorică	0,3	75
Spondilită anchilozantă	0,2	70
Picior strâmb congenital	0,1	68
Boală coronariană	3,0	65
Hipertensiune arterială	5,0	62
Luxație congenitală de șold	0,1	60
Anencefalie și spina bifida	0,3	60
Ulcer peptic	4,0	37
Boală congenitală de cord	0,5	35

Valoarea h^2 variază între 0 – dacă genele nu contribuie la variația fenotipică totală a caracterului – și 1, dacă genele sunt responsabile în totalitate de determinismul acelui caracter. Deci cu cât heritabilitatea este mai mare, cu atât mai mare este contribuția factorilor genetici la realizarea caracterului respectiv (tabel 6.15). De precizat că acest concept teoretic nu dă informații privind numărul de gene implicate sau mecanismul lor de acțiune.

2. Teoriile care explică determinismul genetic al caracterelor multifactoriale

2.1. Distribuția continuă (normală sau gaussiană) a caracterelor poligenice cantitative

Orice caracter fiziologic care poate fi măsurat (talia, greutatea, perimetrul cranian, tensiunea arterială, colesterolul seric, inteligența) este un *caracter cantitativ*. Ereditatea caracterelor cantitative este distinctă de ereditatea monogenică a caracterelor calitative, dar poate fi descrisă în termeni mendelieni dacă se acceptă teoria lui Fisher (1918) a **eredității poligenice**. Potrivit acestei teorii:

- un caracter cantitativ este determinat de acțiunea *simultană a mai multor gene nealele* (loci);
- genele au efecte *cantitative, mici și aditive/cumulative* (spre deosebire de cele monogenice, a căror efect este important și calitativ);
- genele *acționează independent unele de altele*, între ele nu există relații de dominanță și recesivitate;
- caracterele cantitative poligenice prezintă în populație o *distribuție normală*, continuă, de tip gaussian (în formă de clopot) (figura 6.39), spre deosebire de caracterele monogenice a căror distribuție în populație este totdeauna *discontinuă*;

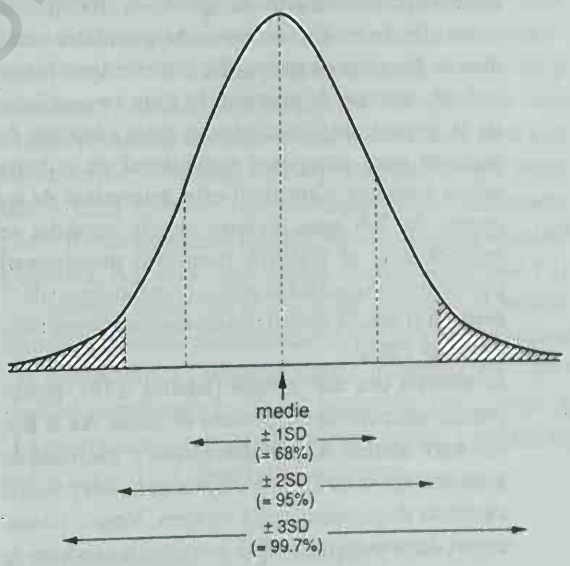


Figura 6.39. Distribuția normală (gaussiană)

Curbele de distribuție normală (gaussiană) se caracterizează prin doi parametri: media (ce determină înălțimea curbei) și depărtarea față de medie sau deviația standard (DS); circa 68%, 95% și 99,7% din observații se încadrează în medie ± una, respectiv două sau trei deviații standard;

- expresia fenotipică a caracterelor poligenice poate fi *influențată de factorii de mediu*;
- deoarece rudele au în comun alele ale acestor gene, mărimea corelației este *dependentă de gradul de rudenie*.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 6.16. Rezultatul combinațiilor dintre doi mulatri

Gameți	AB = 2	Ab = 1	aB = 1	ab = 0
AB = 2	AA;BB = 4 N	AA;Bb = 3 MÎ	Aa;BB = 3 MÎ	Aa;Bb = 2 M
Ab = 1	AA;Bb = 3 MÎ	AA;bb = 2 M	Aa;Bb = 2 M	Aa;bb = 1 MD
aB = 1	Aa;BB = 3 MÎ	Aa;Bb = 2 M	aa;BB = 2 M	aa;Bb = 1 MD
ab = 0	Aa;Bb = 2 M	Aa;bb = 1 MD	aa;Bb = 1 MD	aa;bb = 0 A

Efectul aditiv al mai multor gene și distribuția normală a caracterului determinat de acestea se pot demonstra cu câteva exemple clasice: pigmentația pielii, înălțimea, numărul de creste digitale, tensiunea arterială etc.

Exemplul 1: Pigmentația pielii

- Caracterul depinde de cantitatea de **melanină**, un pigment de culoare brună-neagră depozitat sub formă de granule în celulele tegumentului, în fanere, coroidă. Pigmentația pielii variază de la o populație la alta; selecția naturală fixează cea mai favorabilă combinație de gene, în funcție de condițiile de mediu (de exemplu, populația scandinavă din zone cu puține zile însorite are o foarte redusă cantitate de pigment, în timp ce populația de la tropice are, din contră, o mare cantitate de pigment care protejează organismul de radiația solară intensă). Caracterul este determinat de un număr de 2-6 gene. Printre genele candidat se numără cele ce codifică receptorii membranari pentru melanocortină și proteina melanozomală P, precum și genele pentru tirozinazele melanogenice *TRP1* și *TRP2*.
- În situația cea mai simplă (tabelul 6.16), presupunem intervenția a 2 perechi de alele: **Aa** și **Bb**, din care alelele **A** și **B** determină o cantitate de pigment egală cu **1**, iar alelele **a** și **b** determină o cantitate de pigment egală cu **zero**. Negrii, homozigoți dominanți (**AA**; **BB**), vor avea o cantitate de pigment egală cu **4**, iar albii, homozigoți recesivi (**aa**; **bb**), o cantitate de pigment egală cu **0**. Din încrucișarea între un alb și un negru rezultă totdeauna mulatri (**Aa**; **Bb**). Din căsătoria între 2 mulatri pot apărea în F2: negri (N), mulatri închiși (MI), mulatri (M), mulatri deschiși (MD) și albi (A), în proporția 1:4:6:4:1 (tabelul 6.16). În ipoteza în care caracterul ar fi determinat de 3 alele independente, proporția fenotipurilor în F2 ar fi 1:6:15:20:15:6:1 ș.a.m.d.
- În realizarea culorii pielii intervin însă, în afară de cantitatea de pigment, determinată de un număr mai mare de gene, și alți factori ce țin de individ (sex, vârstă, grosimea tegumentului etc.) sau de mediu (alimentație, lumina solară etc.). De aceea, determinismul acestui tip de caractere este numit, în mod obișnuit, **poligenic, multifactorial.**

Exemplul 2: Înălțimea populației

- Reprezentarea grafică a înălțimii populației este o curbă de tip gaussian, caracteristică distribuției continue, normale (figura 6.40). Se poate vedea că față de înălțimea medie de 170 cm, valorile sunt repartizate simetric, de o parte și de alta a mediei, curba de distribuție luând aspect de clopot. Care este explicația acestei distribuții?

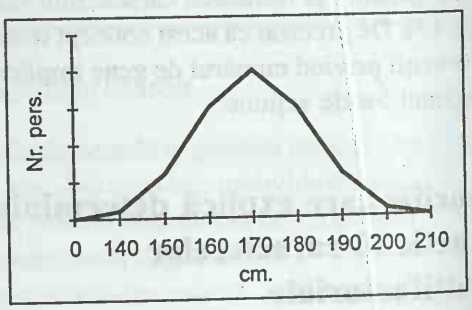
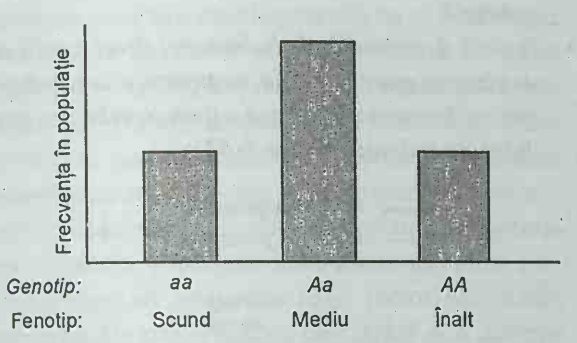


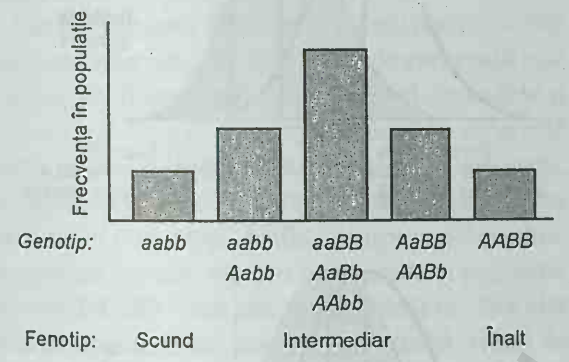
Figura 6.40. Diagrama înălțimii populației de sex masculin din România

- Presupunem (nerealist) că înălțimea ar fi determinată de o singură genă cu 2 alele *A* și *a*. Alela *A* tinde să producă indivizi cu talie înaltă, alela *a* indivizi cu talie joasă. Dacă nu există o dominanță la acest locus, cele 3 genotipuri posibile (*AA, Aa, aa*) vor produce 3 fenotipuri: înalt, mediu și scund. Presupunând că frecvența genelor *A* și *a* în populație este 0,5 pentru fiecare, distribuția, grafic reprezentată, va fi cea din figura 6.41.a.
- Presupunem acum, mai realist, că talia este determinată de doi loci, cel de-al doilea de asemenea cu două alele: *B* pentru talia înaltă și *b* pentru talia scundă. Ele influențează talia exact ca și alelele *A* și *a*. Acum sunt 9 posibilități genotipice și 5 posibilități fenotipice, după cum individul va avea 0, 1, 2, 3 sau 4 alele pentru talia înaltă. Distribuția în populație încă nu este una normală, dar este mult mai apropiată de o distribuție normală decât în cazul anterior cu o singură genă (figura 6.41.b).

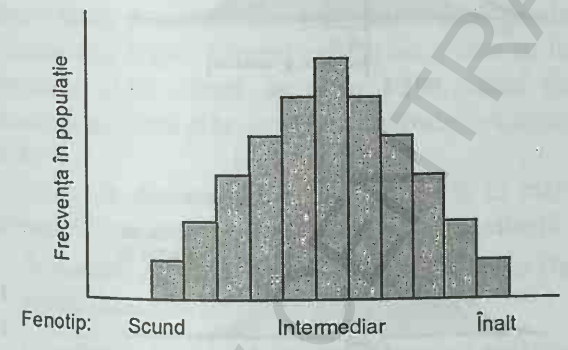
- Dacă extindem exemplul la situația în care mai multe gene și factori de mediu influențează înălțimea, fiecare având un efect redus, rezultă mai multe fenotipuri posibile, fiecare puțin diferit de celălalt, iar distribuția în populație prezintă o curbă în formă de clopot (figura 6.41.c).



a. Diagrama înălțimii populației presupunând că ea este controlată de un singur locus cu genotipurile AA, Aa, aa



b. Diagrama înălțimii populației presupunând că ea este controlată de 2 loci, fiecare cu 2 alele: Aa și Bb



c. Diagrama înălțimii populației presupunând că ea este controlată de gene multipli, fiecare cu un efect mic

Figura 6.41. Diagrama înălțimii în populație presupunând că talia este determinată de un locus (a), doi loci (b) sau mai mulți loci (c)

Din exemplele prezentate se poate concluziona că *un fenotip care are o distribuție normală în populația generală poate fi produs de ereditatea poligenică*, implicând acțiunea mai multor gene, cu efecte aditive deoarece ele *acționează împreună* pentru a determina caracterul respectiv.

Pentru efectul aditiv al mai multor gene pledează și **studiul corelațiilor familiale** pentru caractere cantitative. *Corelația* este o măsură statistică a gradului de asociere al unor fenomene variabile sau, mai simplu, *o măsură a gradului de asemănare sau de relație între doi parametri*. De exemplu, pornind de la faptul că rudele de gradul I (de exemplu părinți-copii, frate-frate) au 50% din gene în comun atunci corelația dintre rudele de gradul I pentru un caracter care este poligenic (talie, inteligență etc.) ar trebui să fie 0,5. Această premisă teoretică a fost validată de studiile care au arătat o corelație frate-frate apropiată de 0,5 pentru înălțime, IQ, număr de creste digitale. Totuși, diferite studii ale unor caractere cantitative au evidențiat *„o regresie față de medie"*. De exemplu, părinți care sunt înalți sau inteligenți au copii a căror înălțime sau inteligență medie este *mai mică* decât media valorilor parentale; dacă aceste caractere ar fi pur poligenice, atunci datele obținute la descendenți ar trebui să se plaseze în jurul mediei valorilor parentale. Or, în realitate, caracterele umane cantitative pot fi influențate de mediu și este, de asemenea, posibil ca unele gene implicate să nu aibă efecte aditive și să acționeze dominant. Toate acestea sugerează existența altor modele de explicație a ereditații multifactoriale.

Folosirea conceptului de distribuție normală a unor caractere morfo-fiziologice cantitative este fundamentală pentru medicina clinică, deoarece permite stabilirea unor standarde normale (de vârstă, sex) pentru caracter și identificarea, prin comparație, a unor valori anormale. Astfel, se conturează un grup de **boli multifactoriale definite clinic cantitativ**, care sunt de fapt valori extreme (± 2 DS) ale distribuției continue a unui caracter normal: hipostatura, obezitatea, unele forme de retard mental, hipertensiunea arterială esențială. Așa cum vom vedea ulterior (capitolul 14), cercetările recente prin studii de asociere la nivelul întregului genom au confirmat acest model și au reușit „să reconcilieze" disputa dintre „mendeliști", care studiau caracterele calitative transmise monogenic și „biometricieni" care studiază caracterele cantitative, poligenice și cu distribuție continuă.

2.2. Distribuția continuă cu prag a caracterelor poligenice calitative

În genetica medicală, multe malformații congenitale izolate și boli comune ale adultului au o distribuție familială și nu prezintă un model de transmitere monogenică. De aceea, firesc, s-a presupus că ele sunt poligenice, multifactoriale, dar – spre deosebire de caracterele cantitative care au o distribuție continuă în populație – ele prezintă *o distribuție discontinuă* (fiind prezente sau absente la o persoană dată, întocmai ca și caracterele monogenice).

Pentru a explica producerea acestor caractere multifactoriale discontinue, Falconer (1971) a extins

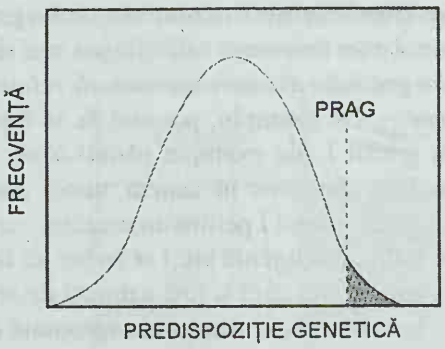


Figura 6.42. Modelul eredității multifactoriale cu prag

teoria poligenică, în aşa numitul **model al susceptibilității cu prag** (figura 6.42). Acesta presupune că toți factorii, genetici sau de mediu, care influențează dezvoltarea unei afecțiuni multifactoriale, formează o singură entitate, numită *susceptibilitate*. În acest concept, susceptibilitatea poligenică reprezentată de un set de multiple variante ADN, care au o distribuție continuă şi care sunt asociate cu o anumită boală; un astfel de set reuneşte efectele mici ale fiecărei variante ADN. Susceptibilitatea genetică este variabilă de la o persoană la alta şi are o distribuție normală (gaussiană) atât în populația generală, cât şi la rudele individului afectat. Curba de distribuție prezintă însă un *prag* dincolo de care indivizii au mai multe alele de risc şi deci o predispoziție mai mare de boală. Boala apare atunci când o persoană cu un număr important de alele de risc (depăşeşte deci pragul de risc) se expune unor condiții defavorabile de mediu, care transformă predispoziția genetică în boală. Sub acest prag, individul este aparent normal; peste prag el *poate fi afectat*.

Atingerea şi depăşirea pragului de risc depinde de *numărul de alele de risc pe care o persoană le moşteneşte de la ambii părinți*. Acest fapt determină o serie de **caracteristici ale bolilor multifactoriale**.

- *Boala are frecvent un caracter familial*; cu cât afecțiunea este mai rară în populația generală, cu atât boala este mai frecventă printre rude (de exemplu, despicăturile labiale, cu o frecvență în populația generală de 2/1.000, au o frecvență de 3% printre rudele de gradul I, în timp ce despicăturile palatine cu o frecvență de 1/1.000 în populația generală, au o frecvență de 5% printre rudele de gradul I).
- *Indivizii afectați se găsesc dincolo de pragul distribuției* în populație a susceptibilității determinate genetic, dar poziția lor exactă nu poate fi definită; de aceea, pentru cele mai multe boli multifactoriale s-a stabilit un *risc empiric*, bazat pe analiza unui număr mare de familii în care apare un bolnav (contrar bolilor mendeliene în care riscul este determinat de modelul specific de transmitere ereditară, AD sau AR sau LX).
- *Părinții bolnavului pot fi sănătoşi sau unul dintre ei poate fi bolnav.*
- *Un bolnav are un risc mai mare* de a avea copii bolnavi comparativ cu persoanele din populația generală.
- *Rudele de gradul I ale bolnavului (frați, copii) au un risc mai mare de boală*, comparativ cu populația generală; riscul scade însă o dată cu scăderea gradului de rudenie (figura 6.43);

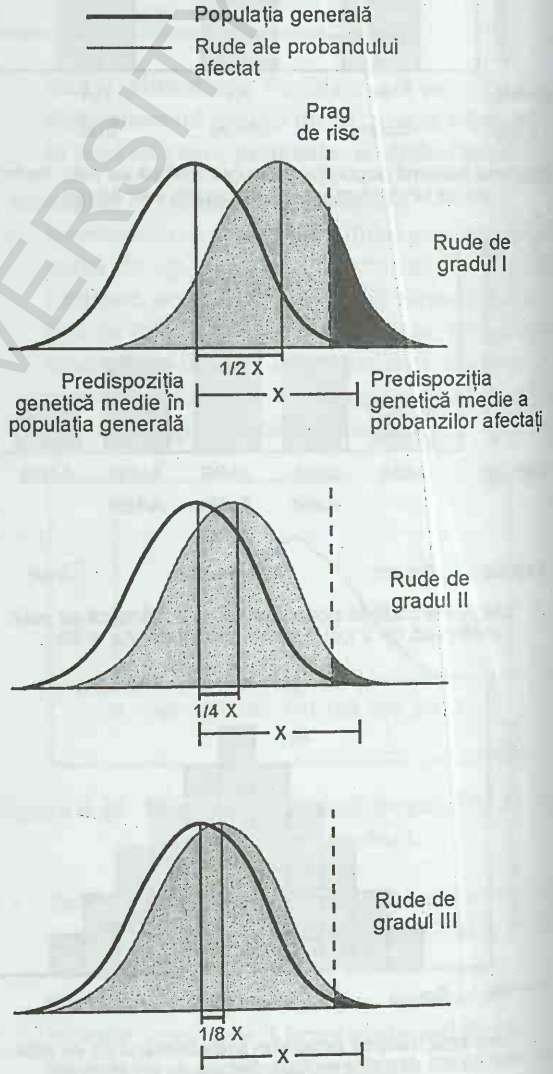


Figura 6.43. Modelul eredității multifactoriale cu prag. Distribuția susceptibilității genetice printre rudele bolnavilor

- *Riscul de îmbolnăvire diferă de la o familie la alta*, în funcție de numărul de alele de risc (spre deosebire de transmiterea monogenică în care riscul este constant); în plus, el *poate fi diferit în populații diferite* datorită faptului că frecvențele alelelor implicate, ca şi ale factorilor de mediu, sunt diferite. De exemplu, riscul empiric pentru defectele de tub neural în SUA este de 2-3%, în timp ce în populația britanică este de 5%.

BCU "VASILE GOLDIŞ" ARAD UNIVERSITY LIBRARY

Aceste caracteristici sunt utile pentru stabilirea naturii multifactoriale a unor boli în care factori genetici multipli determină o predispoziție la boală, iar mediul este cel care transformă vulnerabilitatea în boală. În practică, *diagnosticul de ereditate multifactorială este un diagnostic de excludere*. Trăsăturile clinice ale unei boli multifactoriale nu se deosebesc, de obicei, de trăsăturile similare produsă de o altă cauză. De exemplu, despicătura labiopalatină izolată este, obișnuit, multifactorială. Dar sunt peste 200 de afecțiuni în care despicătura labiopalatină este doar o manifestare în cadrul unui sindrom plurimalformativ specific. Multe dintre aceste condiții sunt consecința unor anomalii cromozomiale, altele ale unor boli monogenice, iar altele ale unor factori de mediu teratogeni. De aceea, uneori, este *dificil de a distinge o boală poligenică de una monogenică cu penetranță redusă sau cu expresivitate variabilă*.

Deoarece factorii de risc sunt diferiți pentru diferite boli multifactoriale, **riscul empiric de recurență** este și el *specific* fiecărei boli în parte, fiind dependent și de *frecvența bolii în populație*. Riscul de recurență pentru rudele de gradul I, adică frați-surori sau copii, este aproximativ egal cu rădăcina pătrată a incidenței generale în populație. Astfel, pentru *malformațiile congenitale izolate*, care au o incidență în populație de circa **1/1.000**, dacă doi părinți sănătoși, fără alte antecedente familiale, au un copil afectat, riscul de recurență la sarcinile următoare este de 1 la 32 sau **3%**; același risc îl au și descendenții bolnavului. Pentru bolile multifactoriale frecvente la adult (boala coronariană, HTA, diabetul zaharat etc.), care au în populație o prevalență de circa **1/100**, riscul de recurență în fratrie și la copiii unui individ afectat este de **10%**.

Riscul la descendenți ***crește peste 5%*** în malformațiile congenitale *izolate* în mai multe situații.

- *În familie sunt mai multe persoane afectate* (în bolile monogenice riscul este constant);

  De exemplu, în cazul **despicăturii labiale ± palatine** (DLP) riscul de recurență după nașterea unui copil afectat este 4%, iar dacă sunt doi copii afectați riscul crește peste 10%); prezența unui al doilea bolnav în familie nu modifică *per se* riscul genetic, ci indică faptul că familia are o predispoziție genetică mai mare și deci un risc de recurență mai mare.

- *Bolnavul prezintă o formă mai gravă de boală*; cu cât defectul este mai sever, cu atât susceptibilitatea genetică este mai mare.

  De exemplu, riscul de recurență în DLP unilaterală este de 2,5%, dar în DLP bilaterală riscul crește la 6%.

- *Dacă unul din sexe este mai frecvent afectat* riscul de recurență este mai mare după nașterea unui copil care aparține sexului mai rar afectat, deoarece probandul care aparține sexului mai puțin susceptibil se află la extremitatea din stânga a curbei pe care se înscrie distribuția susceptibilității (sexul mai rar afectat are nevoie de un număr mai mare de gene pentru a depăși pragul).

  De exemplu, în **stenoza de pilor** rata între sexe a bolii este de 5M:1F, deci sexul masculin este mai frecvent afectat; dacă într-o familie tatăl este afectat recurența este de 5,5% la băieți și de 2,4% la fete; dacă mama a fost afectată, riscurile de recurență sunt mai mari de 19,4% pentru băieți și de 7,3% pentru fete; în **luxația congenitală de șold** sexul feminin este mai frecvent afectat și de aceea bărbații bolnavi au un risc mai mare de a transmite boala la descendenți.

- *Au loc căsătorii consangvine*; persoanele înrudite au un număr mai mare de alele în comun.

2.3. *Modelul mixt, oligogenic, al bolilor multifactoriale*

Chiar dacă modelul susceptibilității cu prag descris anterior este satisfăcător prin criteriile pe care le oferă, pentru unele boli multifactoriale pot fi și alte explicații. Este posibil ca diferite gene implicate în boală să joace *roluri de importanță inegală*. În unele cazuri, un caracter poate fi determinat de acțiunea combinată a unei/unor gene de susceptibilitate cu *efect major* și a unui „fond" multifactorial în care genele adiționale și factorii de mediu au fiecare un *efect adițional mic*.

Dacă luăm din nou ca exemplu talia, putem presupune că variația în înălțime este determinată de un singur locus (sau **genă majoră**) și o componentă multifactorială, *minoră*. Indivizii cu genotipul ***AA*** vor tinde spre o talie înaltă, cei cu genotip ***aa*** spre o talie mică, iar cei cu genotip ***Aa*** spre o talie intermediară. Astfel, cei cu genotip ***aa*** vor avea variații ale taliei între 130 cm și 170 cm, cei cu genotip ***Aa*** vor avea variații ale taliei între 150 cm și 190 cm, iar cei cu genotip ***AA*** vor avea variații ale taliei între 170 cm și 210 cm (figura 6.44)

Din cauza influenței „fondului" multifactorial, există o substanțială suprapunere a celor trei genotipuri majore. Distribuția globală a înălțimii, sub formă de clopot, este determinată de superpoziția celor trei distribuții ale fiecărui genotip.

Acest model în care factorii genetici sunt reprezentați de o componentă monogenică (o genă majoră, cu mai multe alele), o componentă poligenică minoră și factori de mediu se numește **model mixt**. În acest caz, distribuția susceptibilității la boală este rezultanta mai multor distribuții gaussiene corespunzând diferitelor genotipuri posibile (3 dacă sunt 2 alele) ale locusului major.

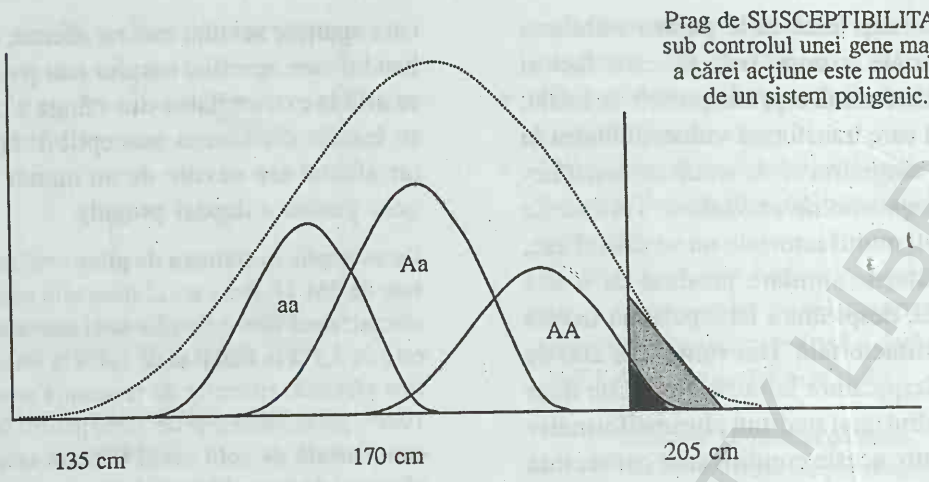


Figura 6.44. Susceptibilitatea la boală determinată de acțiunea unei gene majore al cărui efect este modulat de un sistem poligenic

Teoria oligogenică ar reprezenta de fapt o piesă a spectrului complex al determinismului caracterelor umane, care se plasează în diferite poziții față de cei trei poli: monogenic, poligenic și ecologic. Această teorie deschide o perspectivă optimistă pentru identificarea genelor de predispoziție la boală.

3. Identificarea genelor implicate în bolile multifactoriale

Bolile multifactoriale – fie că este vorba de malformații congenitale izolate sau de boli comune ale adultului – sunt frecvente și au o contribuție majoră la morbiditate și mortalitate. Este deci firesc să se facă eforturi importante pentru *a identifica și localiza genele* care contribuie la etiologia lor, determinând susceptibilitatea la boală. Acest proces, deosebit de actual, va fi analizat în detaliu în capitolul 14; aici vom preciza doar etapele majore care se parcurg în identificarea genelor de susceptibilitate.

- **Studiile de înlănțuire și de asociere** au ca scop stabilirea unei asocieri semnificative a unei anumite regiuni genomice sau variante alelice cu caracterul complex respectiv pe baza *ipotezei boală comună – variantă comună. Studiile de asociere* compară incidența unui anumit *polimorfism,* proteic sau ADN (de tipul SNPs) la bolnavi cu incidența lui într-un grup control; dacă o alelă specifică a locusului polimorfic are o prezență semnificativ mai mare la indivizii cu boală comparativ cu cei neafectați, atunci se poate presupune că alela respectivă este implicată în patogenia bolii. În prezent, datorită progreselor înregistrate în secvențierea genomului uman și în identificarea polimorfismelor ADN se folosesc *studiile de asociere utilizând întregul genom* (în engleză „*genome wide association studies*" - **GWAS**). Se recurge la scanarea întregului genom (cu ajutorul a sute de mii de markeri ADN polimorfici, de tipul SNPs) în scopul identificării regiunilor genomice comune prezente la membrii familiei ce prezintă boala; aceasta permite prezumția că în regiunea sau regiunile respective se află un locus implicat în boală. Identificarea variantei alelice cauzale (care de regulă este diferită de markerul SNP identificat inițial) și determinarea mecanismului prin care această variantă participă la realizarea bolii necesită, evident, alte studii ulterioare. Despre studiile de asociere la scara întregului genom (GWAS) vom discuta pe larg în capitolul 14. Vom preciza aici că aceste studii, considerate inițial ca o „soluție ideală" de identificare a locilor de predispoziție prezintă o serie de limite (caseta 6.7).
- **Cartografierea de finețe** reduce la maximum posibil dimensiunea intervalului critic, la circa 1cM, și se realizează prin studii familiale în care există un dezechilibru a înlănțuirii sau prin studii caz-control.
- **Analizele secvențelor** ADN în intervalul minim este necesară pentru identificarea variantelor nucleotidice prezente, în gene sau în vecinătatea ei.
- **Testele funcționale ale variantelor nucleotidice candidate** (folosind modele celulare sau animale) analizează efectul fenotipic pe care îl produc modificările induse experimental în aceste secvențe.

Întregul proces este amplu și dificil, dar progresele deși lente au permis identificarea unor variante genice implicate în etiologia unor caractere multifactoriale la om, pe care le vom prezenta, așa cum am menționat, în capitolul special dedicat bolilor multifactoriale.

BCU "Iuliu Haţieganu" UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 6.7

Limitele studiilor de asociere

Studiile de asociere la scara întregului genom (GWAS) efectuate pe cohorte mari de subiecți au o capacitate fără precedent de a identifica gene de susceptibilitate cu risc relativ mic. Cu toate acestea, există o serie de limite tehnice și conceptuale care sugerează că studiile GWAS actuale nu vor putea desluși complet arhitectura genetică a bolilor multifactoriale.

Există două ipoteze majore care încearcă să explice în prezent susceptibilitatea genetică la bolile comune ale adultului. Cele două ipoteze nu sunt în mod necesar mutual exclusive:

- ***Ipoteza boală comună – variantă genetică comună** presupune că factorii de susceptibilitate genetică au apărut cu mii de ani în urmă în cursul evoluției speciei umane. Această ipoteză este una controversată, existând atât argumente pro, cât și argumente împotriva sa. De exemplu, faptul că asocierile unor gene cu anumite boli multifactoriale identificate într-o populație pot fi replicate în alte populații suportă originea veche a variantelor genetice respective. Pe de altă parte, este surprinzător faptul că variante genetice care cresc susceptibilitatea la boală au putut fi transmise de-a lungul a numeroase generații, fără a fi eliminate. Explicații posibile sunt faptul că multe boli multifactoriale au debut târziu în cursul vieții și, ca atare, nu sunt supuse mecanismelor de selecție naturală care acționează în perioada reproductivă. În plus, efectele unor asemenea variante genetice în susceptibilitatea la boală sunt foarte mici.*
- ***Ipoteza mutație – selecție** sugerează că o serie de mutații recente explică majoritatea susceptibilității genetice la bolile multifactoriale, care sunt frecvente datorită echilibrului ce există între mutații și procesele de selecție. Potrivit acestei ipoteze multe dintre variațiilor genetice implicate în susceptibilitatea la bolile multifactoriale (după unii majoritatea lor) sunt eliminate la scurt timp după apariție, prin procese de selecție naturală. Mutațiile care au efecte foarte puternice și determină fenotipuri mendeliene au un turnover foarte rapid. În schimb, variantele cu efecte fenotipice ușoare sau moderate pot persista suficient de mult în populație pentru a fi prezente la nivelul unor blocuri haplotipice vechi și pentru a fi identificate prin intermediul studiilor de asociere. Conform acestei ipoteze componenta genetică cea mai importantă în producerea bolilor comune ale adultului este reprezentată de mutații rare, cu o frecvență sub 5% în populația generală și care nu pot fi identificate prin studiile de asociere efectuate în prezent. În schimb, va fi necesară resecvențierea unor gene candidat în cadrul unor studii largi caz-control. Noile tehnologii de secvențiere masivă paralelă fac posibilă o asemenea abordare.*

Bibliografie specifică selectivă

1. Armanios M. *Syndrome of telomere shortening.* Annual Rev Genomics Hum Genet 2009; 10:45-61.
2. Badano JL, Katsanis N. *Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission.* Nat Rev Genet 2002; 3:779-789.
3. Bowles J, Koopman P. *Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals.* Development 2007; 134:3401-3411.
4. Calado RT, Young PD. *Telomere diseases.* N Engl J Med 2009; 361:2352-2365.
5. Chan G, Liu S, Yen T. *Kinetochore structure and function.* Trends Cell Biol 2005; 15:589-598.
6. De Souza CP, Osmani SA. *Mitosis, not just open or closed.* Eukaryot Cell 2007; 6:1521-1527.
7. Ghosh S, Feingold E, Dey SK. *Etiology of Down syndrome: evidence for consistent association among altered meiotic recombination, nondisjunction and maternal age across populations.* J Med Genet 2009; 149A:1415-1420.
8. Glazier AM, Nadeau JH, Altman TJ. *Finding genes that underlie complex traits.* Science 2002; 298:2345-2349.
9. Handel MA, Schimenti JC. *Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility.* Nat Rev Genet 2010; 11:124-136.
10. Hassold TH, Hunt PA. *The origin of human aneuploidy: where we are going.* Hum Mol Genet 2007; 16:R203-R208.
11. Hulten MJ, Patel S, Jonasson J, Iwarsson E. *On the origin of maternal age effect in trisomy 21 Down syndrome: the Oocyte Mozaicism Selection model.* Reproduction 2010; 139:1-9.
12. Hunt PA, Hassold TJ. *Human female meiosis: what makes a good egg go bad?* Trends Genet 2008; 24:86-93.
13. Hunt P, Hassold T. *Female meiosis: coming unglued with age.* Curr Biol 2010; 20:R699-702.
14. Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB. *Chromosomal mosaicism goes global.* Mol Cytogenet 2008; 1:26.
15. Kotzot D. *Complex and segmental uniparental disomy update.* J Med Genet 2008: 45:545-556.

16. Ku CS, Loy EY, Pawitan Y, Chia KS. *The pursuit of genome-wide association studies: where are we now?* J Hum Genet 2010; 55:195-206.
17. Liehr T. *Cytogenetic contribution to uniparental disomy*. Mol Cytogenet 2010; 3:8-15.
18. Lloyd C, Chan J. *Not so divided: the common basis of plant and animal cell division*. Nat Rev Mol Cell Biol 2006; 7:147-152.
19. Mailhes JB. *Faulty spindle checkpoint and cohesion protein activities predispose oocytes to premature separation and aneuploidy*. Environ Mol Mutagen 2008; 49:642-658.
20. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ *et al. Finding the missing heritability of complex diseases*. Nature 2009; 461:747-753.
21. Manolio TA. *Genomewide association studies and assessment of the risc of disease*. N Engl J Med 2010; 363:166-178.
22. McMurray CT. *Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development*. Nat Rev Genet 2010; 11:786-799.
23. Méchali M. *Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers*. Nat Rev Mol Cell Biol 2010; 11:728-738.
24. Oliver TR, Feingold E, Yu K, Cheung V *et al. New insight into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes*. PLoS Genetics 2008; 4:e1000033.
25. Plomin R, Haworth CM, Davis OS. *Common disorders are quantitative traits*. Nature Review Genetics 2009; 10:872-878.
26. Pomerantz RT, O'Donnell M. *Replisome mechanics: insight into a twin DNA polymerase machine*. Trends Microbiol 2007; 15:156-164.
27. Robinson JF, Katsanis N. *Oligogenic disease*. În Speicher MR, Antonarakis SE, Motulsky AG (ed). *Human genetics*. ed. a IV-a, Springer-Verlag, Berlin, 2010.
28. Schiff JD, Luna M, Evans MI *et al. Sex chromosome mosaicism in infertile men with normal caryotypes*. Fertil Steril 2010; 93:1903-1906.
29. Suja JA, Barbero JL. *Cohesin complexes and sister chromatid cohesion in mammalian meiosis*. Genome Dyn 2009; 5:94-116.
30. Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA *et al. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency*. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107:15140-15144.
31. Vanneste E, Voet T, Le Caignes *et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos*. Nat Medicine 2009; 15:577-583.
32. Van Heyningen V, Yeyati PL. *Mechanisms of non-Mendelian inheritance in genetic disease*. Hum Mol Genet 2004; 2:R225-233.
33. Warburton D. *Human female meiosis: new insight into an error-prone process*. Am J Hum Genet 1997; 61:1-4.
34. Zschocke J. *Dominant versus recessive: molecular mechanism in metabolic disease*. J Inherit Metab Dis 2008; 31:89-98.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 7

VARIABILITATEA GENETICĂ

Genetica este știința eredității și a variabilității. Dacă ereditatea determină *conservarea* informației genetice și deci a similitudinii biologice dintre părinți și copii, variabilitatea creează *deosebirile* dintre generații. Dar diferențele fenotipice dintre indivizi pot fi produse fie de modificări ale materialului genetic, fie de factori din mediul înconjurător. Prin **variabilitate genetică** se înțelege ansamblul de fenomene ce produc *diferențele genetice* dintre indivizii unei populații, precum și dintre diferite populații. Datorită acestor diferențe se creează *diversitatea*, premiză esențială a *evoluției*.

A. Sursele de variabilitate

Variabilitatea genetică este produsă prin mutații, recombinări și migrații. Aceste trei fenomene sunt corelate: *mutațiile* determină modificări în structura materialului genetic al unui individ și creează fondul genetic caracteristic unei populații; *migrațiile* unor persoane dintr-o populație în altă populație aduc un potențial genic nou, iar *recombinările* din gametogeneză și fecundare produc un „amestec" al zestrei genetice parentale într-o combinație nouă, specifică descendentului. Cert este că genomul uman nu este o entitate statică, fixă.

1. Mutațiile

Termenul „mutație" a fost folosit pentru prima oară în genetică de către Hugo de Vries, în 1901. Prin **mutație** se înțelege orice modificare în secvența sau aranjarea nucleotidelor din ADN. Aceste modificări sunt *nenaturale (accidentale), permanente și ereditare*. Dacă interesează ADN genic sau regiunile reglatoare, ele pot produce o schimbare detectabilă a fenotipului (dar acest lucru nu este obligatoriu). Celula sau organismul ce prezintă o astfel de modificare se numește *mutant*.

În funcție de *mărimea* materialului genetic interesat – genă, cromozom, genom – mutațiile se pot clasifica în trei mari categorii.

1. **Mutații genice** afectează secvența nucleotidelor unei gene; ele pot interesa întreaga genă sau o parte a ei (rearanjări intragenice) ori numai o pereche sau câteva perechi de nucleotide (mutații punctiforme), formând o variantă alelică a genei normale („*de tip sălbatic*"). Frecvența mutațiilor genice este apreciată la 10^{-5}–10^{-6}/locus/generație.
2. **Mutații cromozomiale** produc schimbări în structura cromozomilor și deci în ordinea liniară a genelor în cromozomi (remanieri cromozomiale: pierderea, câștigul sau rearanjarea unor segmente); ele se produc cu o frecvență de 10^{-4}/diviziune celulară.
3. **Mutații genomice (de ploidie)**, care afectează cantitatea de material genetic și se traduc printr-o modificare a numărului diploid de cromozomi întregi; ele afectează fie 1-2 perechi de cromozomi (aneuploidie), fie toți cromozomii, prin adăugarea a 1-2 seturi haploide (poliploidie). Mutațiile genomice sunt cele mai frecvente mutații la om, 10^{-2}/diviziune celulară. Mutațiile genomice și cromozomiale sunt reunite într-un singur grup numit *anomalii cromozomiale*.

O altă clasificare a mutațiilor se bazează pe *tipul de celule afectate*: *germinale* sau *somatice*. În cazul **mutațiilor germinale** se pot produce gameți anormali care (atunci când individul este fertil), după fecundare, *transmit* mutația la generația următoare, rezultând un individ în care toate celulele vor fi mutante; mutațiile germinale sunt deci *ereditare*. În al doilea caz, cel al **mutațiilor somatice**, descendenții unei celule mutante vor forma o *clonă* celulară anormală, prezentă în anumite țesuturi, rezultând un *mozaicism somatic*. Mutațiile somatice nu se transmit generațiilor viitoare.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

În funcție de *cauză*, mutațiile pot fi clasificate în *spontane* și *induse*. **Mutațiile spontane** sunt cele mai numeroase și se produc prin *erori de copiere* în cursul replicării ADN, *erori de recombinare sau distribuție* în meioză. **Mutațiile induse** sunt determinate de agresiunea unor substanțe chimice (exogene sau endogene), a radiațiilor UV sau ionizante, a virusurilor sau de mobilitatea transposonilor. Urmările acestor atacuri genotoxice sunt reduse prin intervenția unor sisteme eficace de supraveghere, alarmă și reparare. Mutațiile genelor implicate în aceste sisteme cresc semnificativ rata mutațiilor induse, producând – cel mai adesea – cancere.

Consecințele fenotipice ale mutațiilor germinale formează un spectru foarte larg.

- Cele mai multe mutații germinale produse în regiunile necodante ale ADN-ului nu au un efect fenotipic, fiind **mutații neutre**. Ele generează variantele alelice ce alcătuiesc *polimorfismul ADN*-ului. O variantă (alelă) a unui locus ce are o frecvență mai mare de 1% în populație este etichetată ca *polimorfism*, spre deosebire de cele cu o frecvență inferioară care sunt catalogate ca *variante rare*. *Heterozigoția medie* a ADN-ului genomic la om a fost apreciată la 0,001-0,004 (adică 1:250–1:1.000 pb diferă prin secvențele alelice). De notat că unele gene, și în special genele *HLA*, au un polimorfism înalt.
- Uneori mutațiile pot avea *efecte benefice*, producând o mai bună adaptare la mediu și/sau o rezistență mai mare la agresiunile ecologice ori o creștere a „*aptitudinilor reproductive*" (*fitness*). Avantajul selectiv al heterozigoților (Na) purtători ai unei gene mutante se poate înscrie în această categorie (vezi capitolul 8). De exemplu, mutația CCR5-Δ32[1] în stare homozigotă conferă rezistență la infecția cu HIV. Frecvența crescută a acestei mutații în populația europeană este explicată prin selecția pozitivă realizată de repetatele epidemii de ciumă și variolă din cursul Evului Mediu determinată de rezistență crescută a heterozigoților la infecția cu agenții patogeni ai ciumei și/sau variolei (*Yersinia pestis* și *Orthopoxvirus*). Cert este că mutațiile reprezintă „*combustibilul brut care asigură evoluția*".
- Deseori, mutațiile au *efecte dăunătoare* și deci pot fi *patogene*, producând o modificare fenotipică evidentă (letală, subletală, morbidă) sau crescând susceptibilitatea la boală. De menționat că datorită efectelor dăunătoare pe care le au multe mutații, organismele și-au dezvoltat *mecanisme de reparare* sau corecție pentru a elimina mutațiile.

Până acum ne-am referit la mutațiile germinale, care sunt ereditare. Deși *mutațiile somatice* nu se transmit la descendenți, nu înseamnă că medical ele nu sunt importante. Efectul lor va depinde de natura mutației, localizarea ei și de țesutul implicat. Mutațiile somatice pot produce *clone celulare anormale* responsabile de apariția unor afecțiuni degenerative, a diferitelor forme de cancer sau a fenomenului de „îmbătrânire" precoce.

Frecvența și consecințele patogene ale mutațiilor germinale și somatice ne permit să afirmăm că *mutațiile sunt cauza principală de boală la om.*

2. Recombinările genetice

Prin recombinare genetică înțelegem producerea unor *combinații genetice noi* (recombinanți) prin rearanjarea (reasortarea, redistribuția) materialului genetic cuprins în două unități genetice diferite.

Recombinarea genetică este un proces *natural* și reprezintă unul dintre mecanismele prin care se formează indivizi cu calități noi ce vor fi apoi testați, prin selecție naturală, în marea schemă a evoluției biologice.

Procesul de recombinare necesită *o asociere intimă* și apoi o *interacțiune* între două unități genetice diferite; acest mecanism permite, între altele, diferențierea dintre recombinările genetice și mutații.

În funcție de mărimea unităților implicate – genom, cromozom, genă – se pot deosebi mai multe tipuri de recombinare.

2.1. Recombinarea genomică

Recombinarea genomică se realizează *în cadrul procesului sexual* prin asortarea genomurilor din gameții care se unesc pentru a forma zigotul. Reproducerea sexuată asigură nu numai continuitatea și păstrarea genelor și a caracterelor de la părinți la copii, dar și creșterea variabilității urmașilor. Când se unesc doi gameți proveniți de la indivizi neînrudiți, diferiți genetic, descendenții vor prezenta o vitalitate sporită, calități noi, o adaptabilitate mai bună și o fertilitate crescută. Această *vigoare hibridă* sau **heterozis** este consecința heterozigotismului care se creează la descendenți. În cazul încrucișării între indivizi apropiați sau înrudiți (consangvinitate), gradul de variabilitate se reduce și crește fenomenul de omogenizare genetică. Deci *recombinarea genomică este o importantă sursă de variabilitate*, cu condiția ca genomurile care se combină să fie cât mai diferite.

1. CCR5-Δ32 este o deleție a 32 de perechi de baze din gena *CCR5* ce codifică receptorul tip 5 pentru chemokina C. Acest receptor este folosit de virusul HIV pentru a pătrunde în interiorul limfocitelor T.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

2.2. Recombinarea cromozomială

Recombinarea cromozomială se produce în cursul gametogenezei, între cromozomii omologi (cu origine diferită, maternă şi paternă), prin fenomenele specifice meiozei primare (vezi capitolul 6.C.1). Ea poate avea loc între cromozomi „întregi" (recombinare inter-cromozomială) sau între „părţi" din cromozomi (recombinare intra-cromozomială).

a) Recombinarea inter-cromozomială

Recombinarea inter-cromozomială se produce în cursul anafazei meiozei primare, atunci când cromozomii ce formează o pereche de omologi se separă şi apoi se dirijează spre celulele fiice *independent* de alte perechi de omologi. Prin această *asortare independentă* se formează 2^{23} tipuri de gameţi, deci peste 8,4 milioane de gameţi diferiţi, la fiecare dintre cele două sexe (această cifră este valabilă pentru situaţia în care cromozomii se deosebesc prin alelele unei singure gene). După fecundare pot rezulta teoretic 2^{46} combinaţii, valoare ce depăşeşte de opt mii de ori populaţia actuală a globului pământesc. Să nu uităm însă că fiecare cromozom are mai multe gene; de aceea, se poate afirma că *fiecare persoană are o structură genetică unică şi nerepetabilă.*

Asortarea independentă a cromozomilor omologi explică a doua lege a lui Mendel, referitoare la combinarea liberă a „factorilor ereditari" (a genelor) şi distribuţia diferită a unor caractere, normale sau anormale, la descendenţi.

CASETA 7.1

Mecanismul recombinării intra-cromozomiale

Procesul de recombinarea intra-cromozomială sau ***recombinare omoloagă****, o sursă majoră de diversitate genetică, are loc printr-un mecanism molecular care este doar parţial înţeles, dar asemănător cu cel al recombinării omoloage responsabile de repararea rupturilor ADN bicatenare (vezi figura 6.23).*

Înainte de iniţierea procesului de crossing-over *este necesară împerecherea cromozomilor omologi. Acest mecanism, care aduce în imediata vecinătate secvenţele ADN ce vor fi schimbate în cadrul* crossing-over, *pare a fi reglat independent de recombinarea propriu-zisă.*

Procesul de recombinare este iniţiat prin producerea în profaza meiozei a unor rupturi ADN bicatenare în câteva puncte de-a lungul fiecăreia din cele patru cromatide, de către endonucleaza SPO11. Aceste puncte de ruptură nu apar întâmplător de-a lungul cromozomilor ci mai frecvent în regiunile promotor ale genelor şi preferenţial în regiunile cromozomiale bogate în perechi de baze GC. Ulterior are loc îndepărtarea SPO11 şi „rezecţia" capătului 5', sub acţiunea exonucleazică a unui complex proteic (numit ***MRN****, la om, şi format din proteinele RAD50, MRE11, NBS1– la care se ataşează helicaze, nucleaze). Aceasta conduce la formarea unor capete protruzive 3', monocatenare, situate de fiecare parte a unei rupturi şi activarea proteinei ATM („Ataxia Telangiectasia-Mutated") care activează punctele de control în care se verifică integritatea ADN. Apoi, unul dintre aceste capete protruzive 3' va invada o cromatida a cromozomului omolog şi acelaşi proces va fi realizat de către capătul protruziv 3' opus pentru cealaltă cromatidă a cromozomului omolog. Aceste proces de „invazie catenară" este controlat de către recombinazele DMC1 şi RAD51. Rezultă o dublă joncţiune în formă de cruce, numită joncţiune Holliday, urmată de un proces de „reparare" a punctelor de ruptură, prin sinteză de ADN, cu participarea unor ADN polimeraze şi ADN ligaze.*

Etapa finală a acestui proces este rezoluţia joncţiunilor Holliday care este esenţială pentru separarea cromozomilor patern şi matern şi evidenţierea recombinanţilor. Această etapă presupune intervenţia unor rezolvaze încă neidentificate.

Recombinarea omoloagă este folosită de celule şi pentru repararea rupturilor bicatenare (pe calea DSBR) ce apar accidental (sub acţiunea radiaţiilor ionizante sau unor substanţe chimice), fiind una din căile de menţinere a integrităţii genomice în succesiunea generaţiilor de organisme sau celule. Erorile de recombinare pot duce la nedisjuncţie cromozomială (vezi secţiunea C.3.2) şi la rearanjări cromozomiale, iar defectele proteinelor implicate determină un număr de sindroame cu predispoziţie la cancer, inclusiv la predispoziţia pentru cancerul de sân (proteinele BRCA1 şi BRCA2 interacţionează cu proteina RAD51 şi au rol în recombinarea omoloagă).

Menţionăm în încheiere că recombinarea omoloagă este folosită în biologia moleculară ca o tehnică pentru producerea unor modificări ţintite în anumite gene, la animale de experienţă pentru a crea „modele izogenice de boli umane" (premiul Nobel în medicină în anul 2007, pentru Mario Capecchi, Martin Evans şi Oliver Smithies).

b) Recombinarea intra-cromozomială („omoloagă")

Variațiile genotipice individuale produse prin recombinarea inter-cromozomială sunt amplificate prin *schimbul reciproc* și *egal de gene* dintre cromozomii omologi ce se produce prin *crossing-over* în profaza meiozei primare (vezi subcapitolul 6.C.1.1 și caseta 7.1). Prin această **recombinare alelică omoloagă**, cromozomii omologi, care inițial erau diferiți ca origine, suferă o recombinare a alelelor parentale.

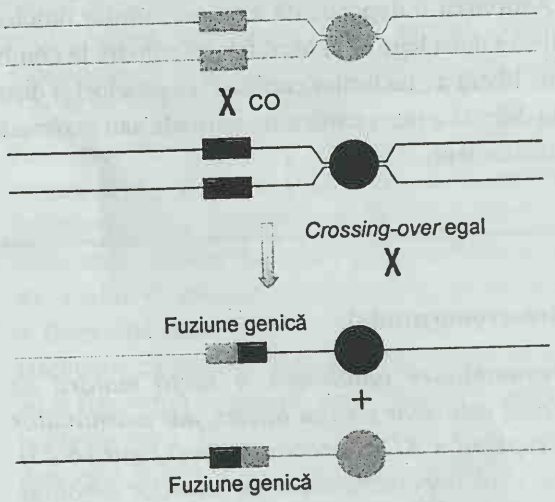


Figura 7.1. Fuziunea genică prin *crossing-over* egal intragenic
(după Strachan și Read, 1999)

2.3. Recombinarea intra-genică

Recombinarea intra-genică se produce printr-un *crossing-over* egal între două alele și produce o genă hibridă sau o **fuziune genică** ce conține un fragment terminal dintr-o alelă și restul de secvență din cealaltă alelă (figura 7.1). Recombinarea intra-genică poate produce și fenomenul de **conversie genică**, la care ne vom referi ulterior.

Fuziunea genică se poate produce și prin alte mecanisme (tanslocații, deleții). Acest proces implică frecvent proto-oncogene, care fuzionate cu un promotor puternic duce la activarea lor producând cancere hematologice, sarcoame și cancer de prostată.

3. Migrațiile

Prin migrații se înțelege *transferul de alele* prin deplasarea unui grup de indivizi dintr-o populație în altă populație cu o compoziție alelică diferită. Prin migrare sunt introduse alele noi în populația gazdă. Asupra acestui mecanism ne vom referi pe larg în capitolul următor, „Genetica populațiilor", dar vom preciza aici că migrațiile au reprezentat și în specia umană o sursă importantă de variații ereditare.

B. Mutațiile genice

Mutațiile sunt definite ca modificări permanente și ereditare ale secvenței nucleotidelor sau aranjării unor regiuni din ADN. Prin aceste modificări se produc *variante alelice* ale secvenței de ADN implicată (genă sau secvență extragenică). Unele dintre aceste variante nu au efect fenotipic sau acesta este minim; alte variante alelice, produse prin mutații, pot fi implicate direct în etiologia unor boli.

Introducerea metodelor de analiză a ADN-ului a permis, în ultimii 20 de ani, realizarea unor progrese remarcabile în identificarea și studiul mutațiilor răspunzătoare de generarea unor boli monogenice. S-a putut astfel defini *spectrul mutațiilor* pentru aceste boli, atât calitativ (tipurile și pozițiile mutațiilor, precum și efectul lor asupra funcției genei), cât și cantitativ (analiza frecvenței mutațiilor în diferite populații sau *epidemiologia moleculară*). Consecințele au fost multiple și pot fi grupate în trei categorii:

- cunoașterea teoretică mai precisă a diversității *mecanismelor mutaționale* ce operează la om și descoperirea unor mecanisme noi (transpoziții, inversii, expansiuni de repetiții trinucleotidice);
- înțelegerea mai precisă a *mecanismelor patogenice* ale unor boli (pierderea totală sau parțială a funcției proteinelor, modificarea sau achiziția unor proprietăți noi ale proteinelor codificate de genele mutante);
- ameliorarea calității și eficienței *diagnosticului* în numeroase boli monogenice, precum și a *sfatului genetic și a diagnosticului prenatal*.

1. Tipuri și mecanisme de producere a mutațiilor genice

Mutațiile ce afectează regiuni mici din genom pot fi împărțite în două mari clase:

- modificări ale unei *secvențe unice* de ADN sau **mutații simple**; acestea sunt de obicei *microleziuni*, interesând unul sau câteva nucleotide;
- modificări ce implică *schimburi* între două secvențe alelice/nealelice de ADN sau **recombinări genice aberante**; ele generează *macroleziuni* (mari deleții, inserții, duplicații, inversii masive, fuziuni de gene), interesând o parte din genă sau chiar întreaga genă.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În funcție de modificarea produsă în secvența de nucleotide a ADN se pot deosebi trei mari categorii de mutații (figura 7.2):

- **substituții nucleotidice** – implică de regulă *înlocuirea* unei singure perechi de baze; mai rar, pot fi înlocuite simultan mai multe nucleotide grupate;
- **deleții** – eliminarea (pierderea) unuia sau mai multor nucleotide din secvența genei, mai rar a unei părți din genă (exoni) sau a întregii gene;
- **inserții** – introducerea (adiția) unuia sau mai multor nucleotide în structura genei, urmată de modificarea tuturor codonilor, după locul inserției; rar, se pot produce inserții largi (prin *transpoziție*), amplificarea (*expansiunea*) unor secvențe repetitive trinucleotidice sau duplicația genei.

Majoritatea mutațiilor sunt modificări *stabile/fixe* ale secvenței de ADN. Recent, s-a descris o clasă nouă de mutații, numite *mutații instabile* sau *dinamice*, în care anumite repetiții trinucleotidice suferă modificări (de obicei expansiuni) atunci când sunt transmise în succesiunea generațiilor.

În funcție de tipul secvențelor din structura genei care sunt afectate, mutațiile pot interesa *secvențele codante* (exonii) sau *necodante* (intronii, secvențele reglatoare), cu efecte variate asupra expresiei informației ereditare și implicit asupra sintezei de proteine (alterarea structurii sau cantității).

Descrierea diferitelor tipuri de mutații se bazează pe o nomenclatură specifică, stabilită de grupuri de experți, prezentată în caseta 7.2.

CASETA 7.2

Nomenclatura mutațiilor

Nomenclatura mutațiilor a fost stabilită de către Genome Database Nomenclature Commitee și poate fi accesată la adresa http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php/. Mutațiile pot fi descrise în două modalități: prin efectul lor sau prin descrierea secvenței modificării.

Nomenclatura pe baza efectului alelei mutante este folosită mai ales la organismele de laborator. O alelă nulă sau amorfă nu produce nici un efect; o alelă hipomorfă produce o cantitate sau o activitate redusă a produsului genei; o alelă hipermorfă determină o cantitate sau activitate crescută de produs; o alelă neomorfă este o alelă cu activitate sau produs nou; o alelă antimorfă este o alelă a cărei activitate sau produs antagonizează activitatea produsului normal.

Nomenclatura pentru descrierea mutației la om precizează tipul de mutație (în ADN) sau modificările aminoacizilor din proteină.

***Substituțiile nucleotidice**. În descriere (de exemplu, 17A>T) se va nota mai întâi numărul nucleotidului începând cu primul nucleotid de la capătul 5' al genei (care este A din codonul inițiator al translației ATG); dacă este necesar să precizăm că mutația este în ADN genomic, ADN mitocondrial sau ARN atunci înaintea numărului se va scrie **g** sau **m** sau **r**. Urmează prima literă, ce reprezintă nucleotidul normal (de „tip sălbatic") simbolul mai mare (>) și apoi a doua literă, ce reprezintă nucleotidul ce-l înlocuiește pe cel normal.*

Pentru modificări în introni se vor specifica numărul intronului (desemnat cu inițialele IVS, de la „intervening sequence") și numărul nucleotidului (+1, +2), începând cu situsul donor 5' sau invers (–1, –2) de la situsul 3'acceptor. De exemplu, IVS33+2T>A reprezintă o mutație în intronul 33 în situsul donor, în care nucleotidul T este înlocuită cu A.

***Substituțiile de aminoacizi**. Aminoacizii sunt desemnați prin codul de trei litere sau, mai frecvent, prin codul cu o singură* literă[2] *(vezi tabelul 4.2) și sunt numărați începând cu metionina (corespunzătoare codonului inițiator) considerată numărul 1. Astfel, mutația (17A>T) din codonul 6 al genei pentru β-globină (ce produce sicklemia) și determină substituția acidului glutamic cu valina, se scrie: Glu6Val sau E6V. O mutație non-sens ce înlocuiește glutamina din poziția 39 a β-globinei cu un „codon stop", producând o formă trunchiată a β-globinei și determinând β⁰ – talasemia, se scrie Gln39X sau Q39X.*

***Delețiile și inserțiile**. Delețiile mici sunt indicate prin termenul „del" (sau litera greacă delta, Δ), scris(ă) după numerele nucleotidelor deletate; de exemplu, 1524-1527del sau 1524-1527delAGTA semnifică deleția a 4 nucleotide (AGTA). Pentru a preciza modificarea aminoacizilor se scrie mai întâi simbolul lor. De exemplu, F508del semnifică deleția fenilalaninei în poziția 508 (această mutație frecventă în gena CFTR și responsabilă de mucoviscidoză s-a scris inițial ΔF508, semnul delta semnificând deleție). Inserțiile mici sunt desemnate similar, cu termenul „ins", după cele două nucleotide între care se produce inserția, urmat de nucleotidele inserate. De exemplu, 1277-1278insTATC în gena HEXA denotă inserția a patru baze între nucleotidele 1277 și 1278, o cauză comună a bolii Tay-Sachs.*

2. Codul cu o literă: A-alanina, C-cisteina, D-acidul aspartic, E-acidul glutamic, F-fenilalanina, G-glicina, H-histidina, I-isoleucina, K-lizina, M-metionina, N-asparagina, P-prolina, Q-glutamina, R-arginina, S-serina, T-treonina, V-valina, W-triptofanul, Y-tirozina; X-semnifică un codon stop.

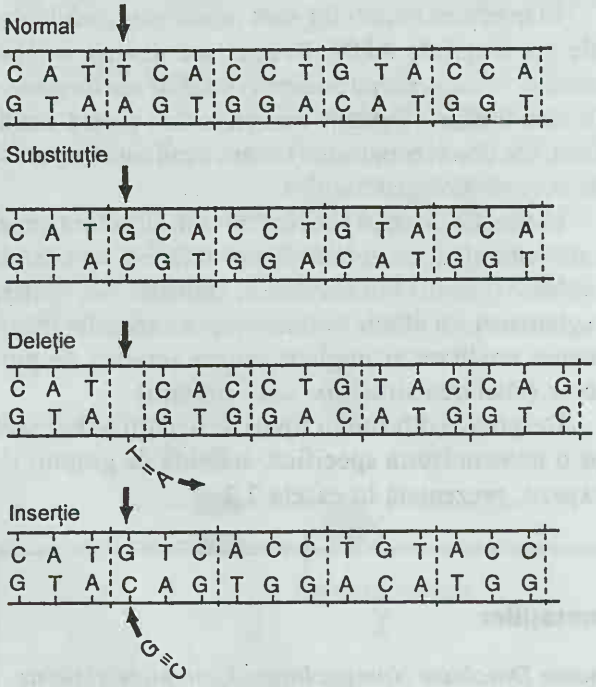


Figura 7.2. Categoriile mari de mutații: substituție, deleție și inserție nucleotidică
(după Nussbaum, McInnes, Willard, 2001)

1.1. Substituția unui nucleotid

Înlocuirea unui singur nucleotid (și deci a unei perechi de baze în ADN-ul bicatenar) este o **mutație punctiformă** și reprezintă cel mai frecvent tip de mutație întâlnit la om. Astfel, din circa 130 de variante anormale ale hemoglobinei umane, 120 sunt produse prin substituții.

a) Tranziții și transversii

Se deosebesc două tipuri de substituții: **tranzițiile**, care reprezintă înlocuirea unei baze pirimidinice (T sau C) sau purinice (A sau G) cu o bază de același tip, și **transversiile**, în care o bază pirimidinică (T sau C) este înlocuită de o bază purinică (A sau G), și viceversa. Teoretic, presupunând că substituția se face la întâmplare, transversiile ar trebui să fie de două ori mai frecvente decât tranzițiile, deoarece orice bază poate suferi două transversii, dar numai o singură tranziție (figura 7.3). În realitate, tranzițiile sunt mai frecvente decât transversiile; excesul de tranziții este determinat probabil de acțiunea combinată a ADN-polimerazei (ce poate încorpora eronat în procesul de replicare mai frecvent o bază *de același tip*) și a sistemelor de corecție (care recunosc mai ușor o încorporare de tipul transversiei, ce antrenează o modificare mai importantă a diametrului moleculei de ADN decât una de tipul tranziției).

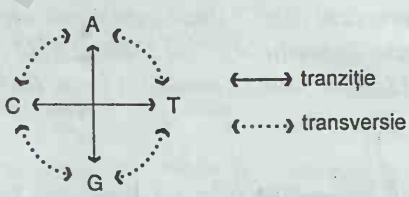


Figura 7.3. Mutații prin substituție: tranziții și transversii

Dintre tranziții, cele ce interesează dinucleotidul CpG (sau 5'-CG-3') sunt mai frecvente decât celelalte dinucleotide (TpG sau CpA), reprezentând cam o treime dintre toate substituțiile. Acest dinucleotid CpG se găsește mai ales în regiunile reglatoare ale transcripției (promotor), sub forma unor **insule CpG**, iar C situată în poziția 5' față de G este frecvent metilată. În plus, citozina suferă deseori o *dezaminare* spontană, transformându-se în uracil, un component anormal al ADN-ului ce este ușor de recunoscut și îndepărtat prin mecanismele de corecție. Dacă dezaminarea interesează metil-citozina, aceasta este transformată în timină, o bază normală din structura ADN-ului; în acest caz, eroarea nu va fi ușor de recunoscut și corectat, producând o tranziție C → T sau G → A în funcție de catena ADN implicată (figura 7.4).

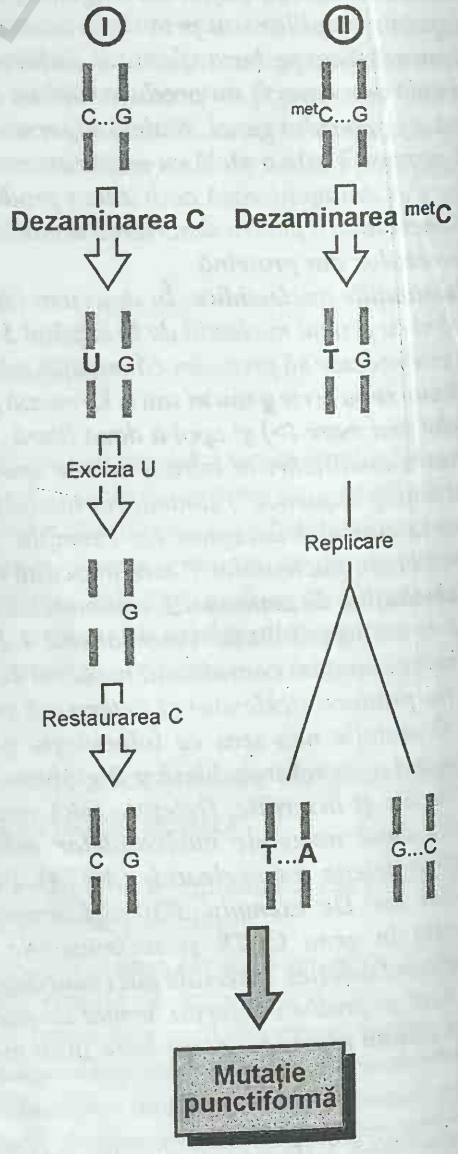


Figura 7.4. Mutații prin dezaminarea citozinei metilate

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

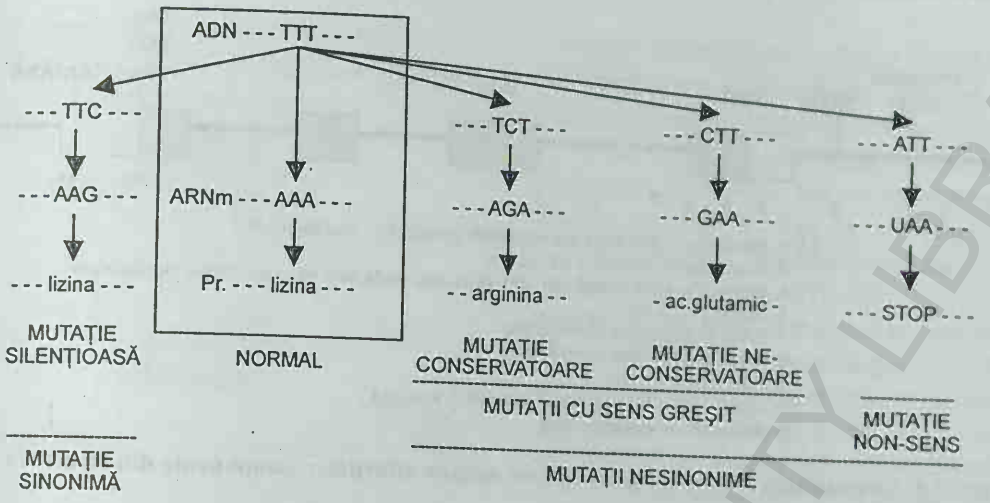


Figura 7.5. Mutații prin substituția unui nucleotid

Dinucleotidul CpG constituie deci *„un punct fierbinte"* de producere a mutațiilor în genomul uman; într-adevăr, tranzițiile în acest dinucleotid au fost găsite, în diferite boli, de 10-20 de ori mai frecvent comparativ cu alte dinucleotide[3] și circa 30% dintre toate substituțiile unui singur nucleotid sunt de acest tip.

b) Efectele substituțiilor asupra informației genetice

Efectele substituției unui nucleotid depind de localizarea intragenică a mutației: secvențe codante, secvențe intragenice necodante și secvențe reglatoare (vezi capitolul 3.B.1).

În regiunile codante (exoni), substituția se poate face într-un codon sens sau non-sens și modifică codonul respectiv, putând să-i schimbe semnificația (figura 7.5).

(1) Substituția într-un *codon sens* poate produce:

- Un *codon sens sinonim*, ce semnifică același aminoacid; mutația este fără efect asupra polipeptidului codificat de genă (care va rămâne nemodificat), este neutră din punct de vedere fenotipic și evolutiv și se numește **mutație silențioasă** (mută) sau **mutație sinonimă**.
- Un *alt codon sens*, ce semnifică un aminoacid *diferit*; aceste mutații *nesinonime*, care alterează „sensul" unui codon, se numesc **mutații cu sens greșit** (*„missens"*). Ele se împart în două grupe:
  - substituții *conservative*, când este înlocuit un aminoacid cu altul ce este chimic și funcțional *similar* (face parte din aceeași grupă; de exemplu, lizina și arginina sunt aminoacizi bazici); adesea, efectul acestei substituții asupra funcției proteinei este minim (ambii aminoacizi având funcții similare);
  - substituții *neconservative*, când este înlocuit un aminoacid cu altul care este chimic și funcțional *diferit*; aceste mutații sunt frecvente (50%) în patologia genetică la om.
- Un *codon nonsens sau stop prematur*, care nu semnifică nici un aminoacid; dacă ARNm este stabil se formează o proteină „trunchiată" (de obicei instabilă și degradabilă[4]); mutațiile nonsens constituie aproximativ 12% dintre toate mutațiile ce produc boli la om.

(2) Substituția într-un codon *nonsens* poate produce:

- Un *codon sens* care semnifică un aminoacid; deci codonul stop este anulat, transcripția continuă până la următorul codon stop și se formează un ARNm mai lung, ce va codifica o proteină anormal de lungă.
- Extrem de rar rezultă *un alt codon stop* (UAA → UAG) și mutația este fără efect asupra proteinei.

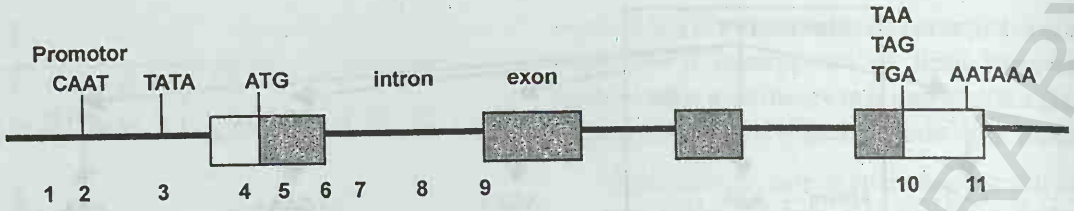
c) Consecințele substituției în raport cu localizarea intragenică

Efectele substituției unui nucleotid depind de localizarea intragenică a mutației: secvențe codante, secvențe intragenice necodante și secvențe reglatoare (figura 7.6).

(1) *Secvențele codante* sunt afectate în marea majoritate a mutațiilor patogene. Predomină substituțiile nucleotidice *nesinonime*, în special mutațiile cu sens greșit care modifica:

3. În unele boli, din motive neclare, această probabilitate crește considerabil; de exemplu, în acondroplazie mutația CpG din gena *FGFR3* este de cel puțin 100 de ori mai frecventă decât cea interesând alte dinucleotide.
4. Efectul depinde de poziția codonului stop, mutațiile localizate la începutul genei fiind de regulă mai grave decât cele din regiunea terminală a genei.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY



1.2.3. Modificări cantitative ale expresiei genice sau mutații mute
4. Anomalie de inițiere a translației
5. Mutații cu sens greșit sau non-sens sau mute sau situs alternativ de matisare
6. Absența matisării
7. Situs 5' alternativ de matisare
8. Situs 3' alternativ de matisare
9. Absența matisării
10. Anularea codonului stop → proteină alungită
11. Anomalii de poliadenilare

Figura 7.6. Consecințele mutațiilor punctiforme asupra diferitelor componente din structura genei

- stabilitatea proteinei, localizarea intracelulară, maturarea proteinei, asamblarea ei în structuri multimerice;
- interacțiunile cu liganzii sau alte proteine;
- situsul funcțional pentru activitatea enzimatică etc.

Totuși, foarte rar, o substituție sinonimă (de obicei neutră) poate cauza un efect patogen prin *activarea unui situs criptic de decupare/matisare* (asemănător celor din introni) ce va determina excluderea unei părți a exonului din ARNm. Remarcăm, de asemenea, că unii exoni pot avea o rată mare de mutații în zonele cu dinucleotide CpG.

(2) *Secvențele necodante intragenice*, și în special intronii, pot fi sediul unor mutații (în circa 10-15% dintre mutațiile patogene). Astfel, alterarea (prin substituție) a situsurilor de decupare a intronilor (în engleză *splice site mutations*) – situsul donor (5'-GT) sau acceptor (AG-3') – face ca excizia să se producă la următorul exon și, ca atare, în ARNm matur se va încorpora o parte sau întregul intron ori va lipsi un exon (în engleză – *exon skipping*), în funcție de situsul afectat. Ambele situații au consecințe importante asupra expresiei genei (ARNm instabil; polipeptid nefuncțional). Ocazional, au fost descrise mutații patogenice și în secvențele 5'UTR (hemofilia B Leyden) sau 3'UTR, transcrise, dar netranslate, din primul și ultimul exon; ele pot modifica rata sintezei proteice.

(3) *Secvențele reglatoare* pot suferi mutații care, evident, modifică rata transcripției (dacă afectează elementele promotorului și interacțiunea lor cu factorii de transcripție) sau stabilitatea moleculei de ARNm formate (când afectează situsul de poliadenilare din regiunea 3') și deci, în final, cantitatea de proteină sintetizată; astfel de mutații se întâlnesc în talasemii.

d) Mecanismele posibile de producere a substituțiilor

Substituțiile nucleotidice pot fi produse fie spontan, prin erori în procesul normal de replicare a ADN, fie prin leziuni provocate în ADN de factori mutageni (chimici sau fizici).

- *Erorile de replicare* a ADN apar prin împerecherea greșită a nucleotidelor (vezi capitolul 6.A.3.4). Majoritatea sunt îndepărtate rapid prin procesul de corecție, fie de către ADN-polimeraza δ, fie prin alte mecanisme de reparare; în final, rămân puține erori de replicare, aproximativ *o mutație nouă la fiecare diviziune celulară.*
- Mutațiile pot apărea și prin procese chimice spontane de *depurinare*, *dezaminare*, *demetilare* sau după expunerea la mutageni chimici sau fizici (radiații ionizante sau ultraviolete).

1.2. Deleții și inserții mici

Un al doilea tip major de mutații este reprezentat de către delețiile sau inserțiile unuia sau mai multor nucleotide; ele reprezintă circa un sfert dintre toate mutațiile responsabile de producerea bolilor genetice la om.

- Dacă delețiile sau inserțiile sunt un *multiplu de trei nucleotide*, se produce lipsa sau adiția unui/unor aminoacizi în proteină. Un exemplu interesant este cel al mutației ΔF508 (sau F508del, după nomenclatura actuală), ce produce aproape 70% dintre cazurile de fibroză chistică la europeni; prin deleția a trei perechi de nucleotide din gena *CFTR* rezultă pierderea fenilalaninei (F) din poziția 508 a proteinei (vezi capitolul 12.B.4).
- Atunci când numărul nucleotidelor deletate sau inserate nu este un multiplu de trei se produce o *decalare (defazare) a cadrului de lectură al genei* de la locul în care s-a produs deleția sau inserția (figura 7.7); să ne reamintim că citirea informației genetice se face continuu, în grupe de trei nucleotide sau codoni adiacenți, formați prin simpla grupare câte trei (vezi subcapitolul 4.C.2.1). Aceste mutații (în engleză – *frameshift mutations*)

produc frecvent un codon stop în *aval* de locul deleției/inserției, rezultând o proteină trunchiată.

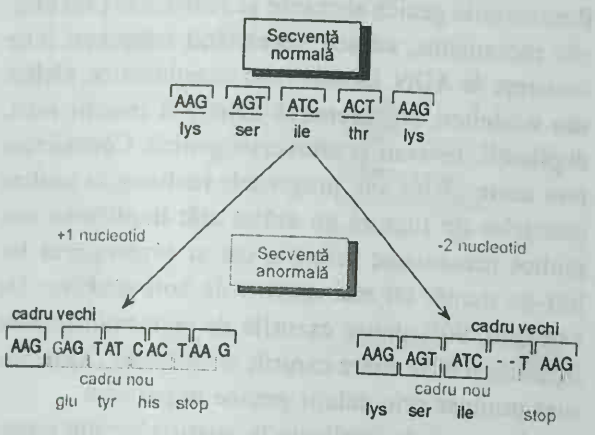


Figura 7.7. Mutații prin deleția/inserția unor nucleotide

Delețiile și inserțiile câtorva nucleotide survin cel mai adesea la nivelul unor secvențe scurte, repetate în tandem, printr-un mecanism de *glisare sau derapare replicativă* (în engleză – *slipped strand mispairing*) determinat de împerecherea decalată a acestor secvențe repetate. Așa cum se observă în figura 7.8, secvențele repetate din catena nou-sintetizată (de exemplu, CAG CAG...) se pot alinia greșit (*glisează* înainte sau înapoi) față de secvențele repetitive complementare, corespunzătoare catenei de ADN matriță (de exemplu, GTC GTC...). În funcție de direcția de glisare, în catena nou-sintetizată se produce *inserții* (prin glisarea spre înapoi) sau *deleții* (prin glisare spre înainte). Acest fenomen de glisare replicativă se produce frecvent în cazul *microsateliților sau minisateliților*, determinând polimorfismul cunoscut al acestor secvențe repetate în tandem de un număr variabil de ori (VNTR). El ar putea fi la originea expansiunii repetițiilor trinucleotidice (vezi secțiunea 1.4). Unele gene implicate în etiologia unor boli (gena *CFTR* implicată în fibroza chistică, gena *F9* – pentru factorul IX implicat în hemofilia B, gena *APC* – pentru polipoza adenomatoasă de colon ș.a.) posedă *în secvența codantă* o serie de repetiții în tandem ale

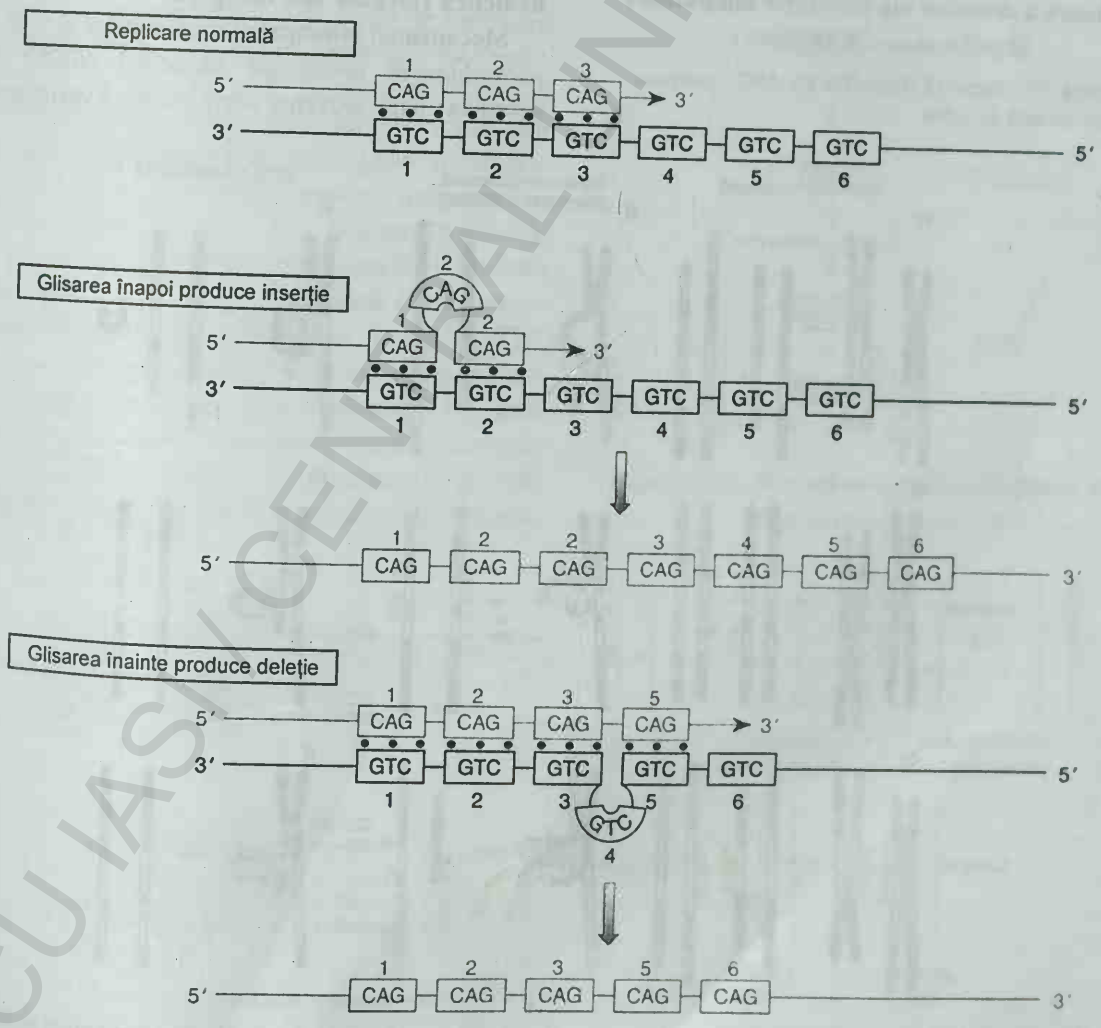


Figura 7.8. Glisarea replicativă prin împerecherea greșită a secvenței CAG repetată în tandem
(după Strachan și Read, 1999)

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

unui număr mic de nucleotide (figura 7.9) ce pot fi implicate în fenomenul derapării replicative, producând deleția sau inserția unității repetitive, fapt ce va genera decalarea cadrului de lectură (o mutație *frameshift*).

Inserțiile unor extra nucleotide în ADN pot fi produse de elemente transpozabile.

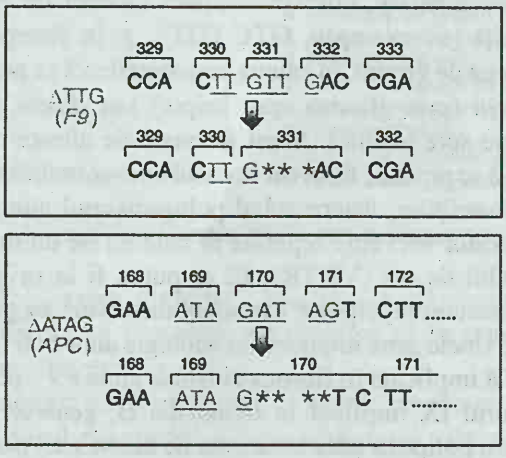


Figura 7.9. Scurte repetiții în tandem din structura unor gene, „puncte fierbinți" de producere a delețiilor sau inserțiilor nucleotidice

(după Strachan și Read, 1999)

Legendă: F9 – factor IX (hemofilie B); APC – polipoza adenomatoasă de colon

1.3. Remanieri genice aberante

Remanierile genice aberante se realizează prin diferite mecanisme, adesea necesitând schimburi între secvențe de ADN, identice sau cvasiidentice, alelice sau nealelice, și generează deleții și inserții mari, duplicații, inversii și conversii genice. Considerate rare acum câțiva ani, progresele realizate în analiza punctelor de ruptură au arătat atât implicarea mai multor mecanisme diferite, cât și evidențierea lor într-un număr tot mai crescut de boli genetice. De exemplu, 90% dintre cazurile de *amiotrofii spinale infantile* și 60% dintre cazurile de *miopatie Duchenne* sunt produse prin deleții genice importante.

Mecanismele implicate în apariția acestor remanieri pot fi clasificate în *mecanisme nereplicative*, remanieri realizate în afara fazei S de replicarea a ADN – *recombinarea omoloagă nealelică* și *recombinare neomoloagă* –, și *mecanisme replicative*, ce se produc în faza de replicarea a ADN.

a) Remanieri genice prin recombinare omoloagă nealelică (inegală sau ectopică)

Mecanismul principal al remanierilor genice este *recombinarea omoloagă nealelică (RON)* (sau ectopică) între secvențe identice sau cvasiidentice,

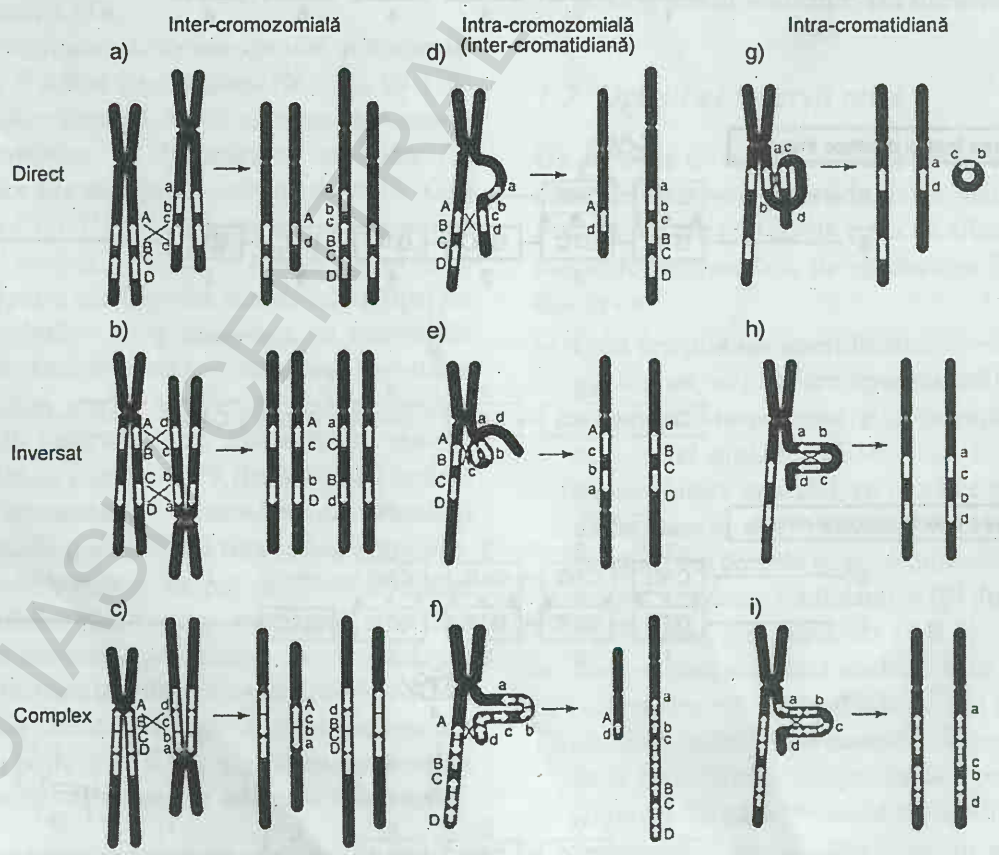


Figura 7.10. Reprezentarea schematică a mecanismelor de producere a remanierilor genomice prin recombinare omologă nealelică inter-cromozomială, intra-cromozomială sau intra-cromatidiană

(după Stankiewicz și Lupski, 2002)

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

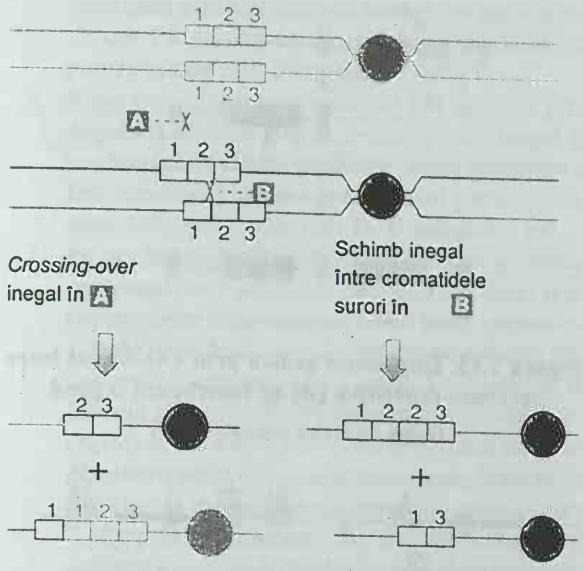


Figura 7.11. Deleții și duplicații (prin inserție) produse prin *crossing-over* inegal (A) și schimb inegal între cromatidele surori (B)

(după Strachan și Read, 1999)

situate (în câteva exemplare) în amplasări diferite de-a lungul cromozomilor (sub formă de duplicații segmentale sau de repetiții cu număr mic de copii – „*low copy repeats*"). Ea se produce de obicei în profaza meiozei I atunci când cei doi cromozomi omologi se împerechează greșit (prin secvențele repetitive identice) – RON meiotică (inter-cromozomială; figura 7.10.a) –, sau, mai rar, în mitoză, prin schimb fie între cromozomii omologi, fie între cromatidele surori – RON somatică (intra-cromozomială ori inter-cromatidiană – figura 7.10.b). Această recombinare poate duce fie la un schimb reciproc (*crossing-over*) *inegal* (figura 7.11), prin care se modifică *ambele* cromatide (deleție sau duplicație „în oglindă", inversie), fie la o **conversie genică**, care este un transfer *unidirecțional* de informație, modificându-se numai una dintre cromatide. Poate exista și o recombinare intra-cromatidiană (figura 7.10.c) între secvențe omoloage situate pe aceeași cromatidă.

Aceste situații sunt ilustrate prin mai multe exemple.

- *Regiunea ce cuprinde gena-țintă este duplicată în tandem.* Astfel, genele α1 și α2, ce codifică lanțurile de alfa-globină ale hemoglobinei, sunt produse printr-o duplicație recentă; împerecherea greșită α1-α2 (figura 7.12) va genera, prin *crossing-over* inegal, deleția sau duplicația unei gene α. Aceeași situație se întâlnește și pentru gena *SMN* (de la *survival motor neuron*) duplicată în regiunea 5q11.2-13.3; prin *crossing-over* inegal se produce deleția exonilor 7 și/sau 8 ai genei, ceea ce generează *amiotrofia spinală infantilă* (vezi figura 6.17).
- *Conversia genică este produsă prin schimburi nereciproce* (unidirecționale), de mărime variabilă (de la câteva pb la câteva Kb), între gene vecine foarte asemănătoare, dar neidentice. Ele se pot împerechea greșit, și atunci una dintre gene – *donor* (deseori o pseudogenă rezultată în urma

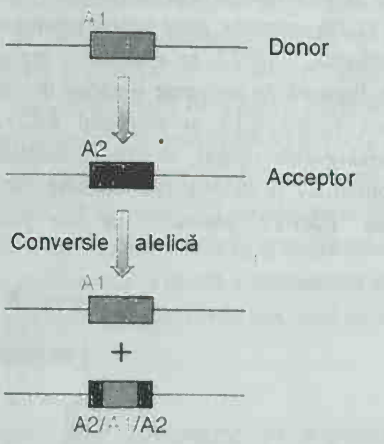
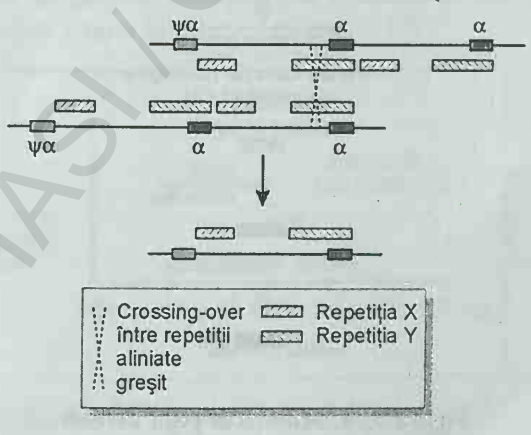


Figura 7.13. Mecanismul conversiei genice alelice

(după Strachan și Read, 1999)



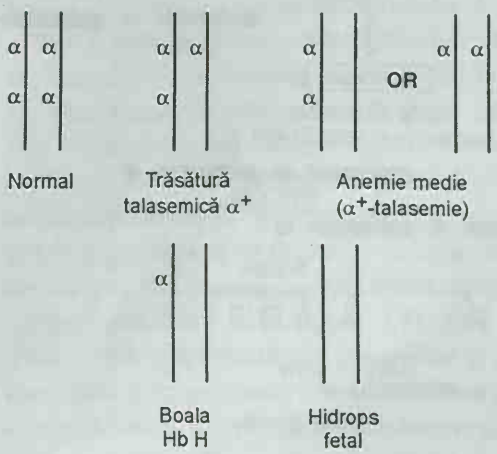


Figura 7.12. Deleția genelor α-globină (prin *crossing-over* inegal) în diferite forme de α-talasemie

(după Strachan și Read, 1999)

BCU IAȘI / CENTRUL UNIVERSITAR PAYY

inactivării prin mutații) – rămâne neschimbată, iar cealaltă – *acceptor* – este modificată, primind o parte din secvențele donorului (figura 7.13.). Exemplul cel mai tipic privește genele codante pentru 21-hidroxilază, *CYP21A1* (denumită inițial *CYP21A*) și *CYP21A2* (desemnată inițial *CYP21B*), situate pe brațul scurt al cromozomului 6 în regiunea HLA (vezi figura 3.3.c); numai gena *CYP21A2* este funcțională, cealaltă genă – *CYP21A1* – este o pseudogenă ce a acumulat numeroase mutații inactivatoare. Circa 75% dintre cazurile de hiperplazie congenitală de suprarenală prin deficiență de 21-hidroxilază sunt consecința mutațiilor ce apar în gena *CYP21A2*, ca urmare a conversiei genice între pseudogena *CYP21A1* și gena funcțională *CYP21A2*; restul cazurilor sunt produse prin deleția genei *CYP21B* prin *crossing-over* inegal (figura 7.14). Mecanismul de conversie genică pare implicat în generarea polimorfismului extrem al genelor complexului HLA.

- *Regiunea ce cuprinde gena-țintă este flancată/încadrată de secvențe repetitive scurte, identice,* care prin împerechere greșită și *crossing-over* inegal vor genera deleția sau duplicația genei (figura 7.15). De exemplu, gena pentru proteina mielinică periferică, *PMP22*, se află într-o regiune de 1,5 Mb flancată de secvențe identice de circa 30 Kb (vezi figura 6.17 și capitolul 6.C.1.3). După *crossing-over* inegal, se produc duplicația (pe o cromatidă) și deleția (pe cealaltă cromatidă) a genei *PMP22*, *anomalii* ce vor genera două

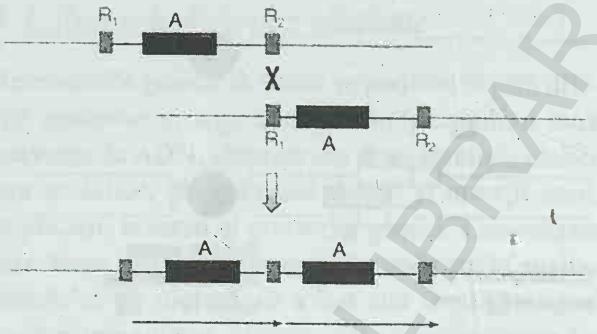


Figura 7.15. Duplicație genică prin CO inegal între secvențe repetitive (R) ce flanchează o genă
(după Strachan și Read, 1999)

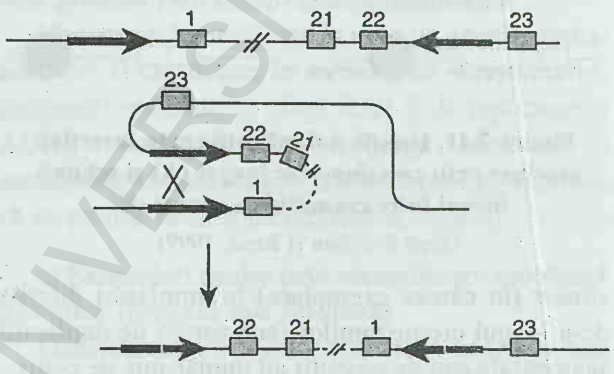


Figura 7.16. Recombinare omoloagă aberantă între secvențe omologe inversate situate pe aceiași cromatidă
(după Nussbaum *et al.*, 2001)

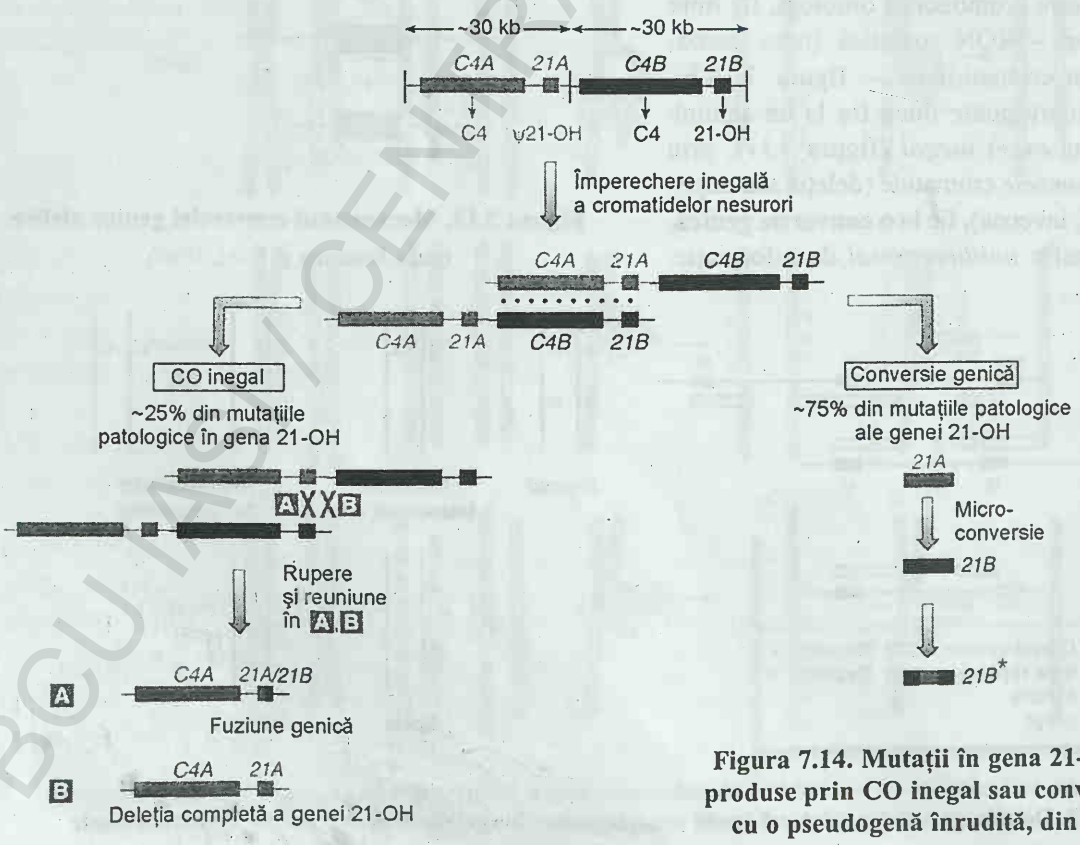


Figura 7.14. Mutații în gena 21-hidroxilază produse prin CO inegal sau conversie genică cu o pseudogenă înrudită, din apropiere
(după Strachan și Read, 1999)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

neuropatii ereditare diferite: boala Charcot-Marie-Tooth 1A şi, respectiv, neuropatia ereditară cu pareze induse prin compresiune (HNPP).

- *Repetiţiile dispersate nealelice* (de tip *Alu*) predispun la aliniere greşită, *crossing-over* inegal şi producerea de deleţii/duplicaţii; acest mecanism a fost identificat în gena receptorului pentru LDL, gena *NF1*, gena factorului IX al coagulării etc.
- *Pe acelaşi cromozom, în interiorul sau vecinătatea genei-ţintă se găsesc secvenţe identice*; prin recombinare intra-cromozomială (deci intramoleculară) între două copii se pot produce deleţii sau inversii ale unei porţiuni a genei. De exemplu, în intronul 22 al genei pentru factorul VIII al coagulării (Xp28) se află o mică secvenţă nucleotidică ce se mai găseşte repetată, dar cu orientare opusă, de cel puţin două ori, la extremitatea telomerică a genei (figura 7.16); prin recombinare între secvenţa intronică şi una dintre secvenţele omoloage se produce o inversie a primilor 22 de exoni ai genei *F8*. Această mutaţie recurentă produce circa 50% dintre cazurile severe de *hemofilie A*. Acelaşi fenomen se întâlneşte în *boala Hunter*, o mucopolizaharidoză legată de X.

Toate cazurile descrise mai sus fac parte din categoria **bolilor genomice** ce sunt produse prin *recombinarea omoloagă nealelică* între regiuni specifice din genom, cu duplicaţii sau cu un număr mic de repetiţii identice sau foarte asemănătoare. Acesta pare să fie un mecanism frecvent (10^{-4}) şi important de producere a unui nou tip de boli, numite *boli genomice* (Lupski, 1998) (vezi capitolul 9); ele sunt determinate de „arhitectura" specifică a genomului uman şi prin aceasta se deosebesc de bolile monogenice convenţionale, produse prin mutaţii specifice în structura unei gene (de obicei consecinţa unor erori de replicare şi/sau reparare). În funcţie de *mărimea* segmentului genomic implicat şi de numărul de gene localizate în segmentul remaniat, deleţia şi/sau duplicaţia rezultate prin recombinare aberantă (inter-cromozomială, intra-cromozomială sau intra-cromatidiană) pot produce: o boală mendeliană, un sindrom al genelor contigue sau o anomalie cromozomială a unui braţ întreg (figura 7.17).

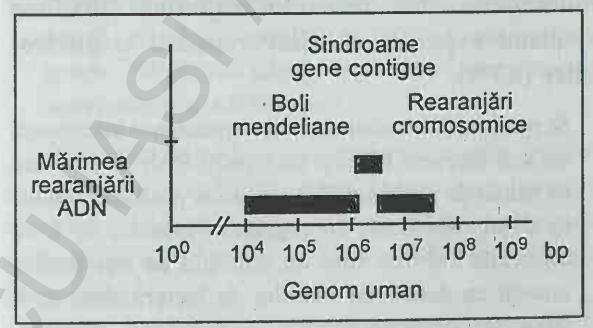


Figura 7.17. Diferite tipuri de „boli genomice" în funcţie de mărimea secvenţei de ADN implicată în rearanjament
(după Stankiewicz şi Lupski, 2002)

b) Remanieri genice prin recombinare neomoloagă sau nelegitimă

Remanierile genice se pot produce şi prin evenimente de recombinare neomoloagă sau nelegitimă între secvenţe care nu prezintă omologie de secvenţă. Mecanismele moleculare ale recombinării nelegitime sunt încă incomplet cunoscute. Anumite elemente din structura regiunii genomice, ce favorizează apariţia rupturilor dublu catenare ale ADN-ului, reprezintă „puncte fierbinţi" pentru aceste recombinări: secvenţele alternante de purine-pirimidine, secvenţe ce favorizează apariţia structurilor non-B ale moleculei de ADN, **regiunile MAR** (de la *matrix-associated region*) bogate în nucleotide A/T, situsurile de clivare ale topoisomerazelor, secvenţele în palindrom etc.

c) Recombinări genice prin mecanisme replicative

Au fost descrise numeroase mecanisme replicative (tabelul 7.2) implicate în apariţia remanierilor non recurente, remanieri caracterizate prin mărimea variabilă a regiunii rearanjate şi poziţia diferită a punctelor de ruptură. Realizarea acestui tip de remanieri necesită prezenţa de regiuni cu omologie de secvenţă: microomologii de câteva perechi de baze (2-10) sau omologii mai mari (20-50 perechi de baze), posibile datorită existenţei de elemente repetate (spre exemplu, de tip *Alu*) sau de microsateliţi. Aceste mecanisme sunt implicate atât în apariţia remanierilor cu efect patogenic, cât şi în cea a variantelor structurale de tip CNV (*Copy Number Variation*, vezi subcapitolul 7.D.2).

1.4. Mutaţiile dinamice şi expansiunea repetiţiilor nucleotidice

După anul 1991 s-a descoperit un grup de boli genetice produse printr-un tip particular de mutaţii, numit **mutaţii dinamice** sau **instabile**. Ele interesează *microsateliţii*, caracterizaţi prin repetiţii în tandem ale unui număr mic de nucleotide (între 1 şi 6), cel mai frecvent repetiţii dinucleotidice sau trinucleotidice. Microsateliţii prezintă variaţii individuale ale numărului de copii, produse prin *mecanismul de glisare sau derapare replicativă* determinat de împerecherea greşită, decalată, a secvenţelor repetate (vezi subcapitolul 7.B.1.2 şi figura 7.8). Prin glisarea „înapoi" rezultă inserţii ale repetiţiilor şi creşterea numărului (expansiunea) lor; prin glisarea „înainte" se produc deleţii ale repetiţiilor şi reducerea numărului („contracţia") lor. Expansiunea repetiţiilor nucleotidice este, pentru motive necunoscute, mai frecventă decât contracţia. Identificarea acestui nou mecanism

Tabelul 7.2. Mecanisme replicative implicate în apariția remanierilor genomice
(adaptat după Zhang *et al.*, 2009)

Mecanism	Cauze	Rupturi dublu catenare	Proces	Caracteristici ale punctelor de ruptură
FoSTeS (*Fork Stalling and Template Switching*)	Pauză a furcii de replicare	Absente	Schimb de catenă matriță între furci de replicare diferite	Micro-omologii (câteva perechi de baze)
MMBIR (*Microhomology-Mediated Break-Induced Replication*)	Colaps al furcii de replicare sau ruptură a catenei matriță	Necesare	Schimb de catenă matriță între furci de replicare diferite	Micro-omologii (câteva perechi de baze)
BIR (*Break-Induced Replication*)	Ruptură ADN la nivelul furcii de replicare	Necesare	Reparare a rupturii ADN-ului matriță prin recombinare omoloagă cu o altă moleculă de ADN matriță aparținând unei alte furci de replicare; necesită proteina Rad52	Omologii
MMIR (*Microhomology-Mediated Induced Replication*)	Ruptură ADN la nivelul furcii de replicare	Necesare	Reparare a rupturii ADN-ului matriță prin recombinare omoloagă cu o altă moleculă de ADN matriță aparținând unei alte furci de replicare; mecanism realizat fără participarea proteinei Rad52	Micro-omologii sau microsateliți
SMR (*Strand Misalignment-Realignment*) **SRS** (*Serial Replication Slippage*)	„Alunecare" între catena matriță și cea neosintetizată	Absente	Catena ADN neosintetizată se separă și se reasociază decalat la catena matriță la nivelul unei regiuni cu omologie de secvență, reluând replicarea ADN. Proces repetat în cazul SRS.	Micro-omologii sau microsateliți

mutațional a fost o surpriză deoarece se deosebește fundamental de restul mutațiilor permanente și stabile care, o dată produse, se transmit nemodificate în succesiunea generațiilor și sunt prezente la toți bolnavii dintr-o familie.

Caracteristica definitorie a mutațiilor dinamice o constituie *instabilitatea* lor, exprimată cel mai adesea prin creșterea numărului de repetiții nucleotidice. Instabilitatea devine manifestă cu ocazia diviziunilor pe care le realizează celula purtătoare, fie în timpul transmiterii de la părinți la descendenți (instabilitate inter-generațională sau „***instabilitate meiotică***"), fie prin mitoză („***instabilitate mitotică***"), producând variații de mărime ale expansiunii în țesuturile unui individ afectat (mozaicism somatic). Instabilitatea se exprimă clinic sub formă de boală atunci când este depășit un anumit *prag critic* al numărului de repetiții (diferit de la genă la genă). Sub pragul critic variațiile numărului de repetiții nucleotidice generează polimorfisme „*benigne*" ale ADN; în aceste cazuri expansiunea este *stabilă* și gena funcționează normal. Uneori, expansiunea repetițiilor nucleotidice poate produce *situsuri fragile nepatogene*, observate în anumiți cromozomi la anumite persoane (supuse unui stres replicativ); de exemplu, situsul *FRA16A* prin expansiune repetițiilor $(CCG)_n$.

Deseori însă, mutațiile dinamice în anumite gene produc boli genetice. În aceste situații, după depășirea pragului critic, expansiunea repetițiilor nucleotidice devine *instabilă* (în meioză sau mitoză) și numărul de repetiții crește semnificativ. Se produce o alelă nepatogenă („**premutație**"), cu un număr intermediar de repetiții, care atunci când este transmisă de la părinți (prin meioză și gameți) la copil se expansionează rapid producând o alelă cu **mutație completă**, care determină boală. De exemplu, repetiția $(CGG)_n$ în gena *FMR1* este stabilă între 6-50 de repetiții, alelele cu premutație au 50-200 repetiții, iar alelele cu mutație completă ce produc sindromul X fragil au peste 200 repetiții.

În prezent se cunosc 22 de afecțiuni neurologice sau neuromusculare determinate de expansiunea repetițiilor nucleotidice, marea lor majoritate (19) fiind rezultatul **expansiunii unor repetiții trinucleotidice** (RTN).

> Se pune firesc întrebarea: de ce expansiunea interesează cel mai frecvent RTN și nu repetițiile de 2 sau 4 sau alt număr de nucleotide? O explicație posibilă, valabilă în cazul repetițiilor în regiunile codante, ar fi că repetițiile care nu sunt un multiplu de trei produc mutații cu decalarea cadrului de lectură, care ar fi letale; deci repetițiile non-trinucleotidice ar fi „mascate" de letalitatea embrionară.

Dintre bolile cele mai frecvente prin RTN citățm (tabelul 7.3): sindromul X fragil – produs de repetiția

Tabelul 7.3. Exemple reprezentative de boli prin repetiții trinucleotidice

Boala	Localizarea genei	Mod de transmisie	Repetiție	Localizarea repetiției	Număr de repetiții			Efect parental
					Alela normală	Premutație	Mutație completă	
Sindromul X fragil (FRAXA) (1:4.000)	Xq27.3	DLX (anticipație)	CGG	5'UT	< 50	50-200	> 200	matern
Distrofia miotonică tip 1 (1:8.000)	19q13.3	AD (anticipație)	CTG	3'UT	< 37	37-50	> 50	matern
Ataxia Friedreich (1:50.000)	9q13	AR	GAA	Intron 1	5-30	31-100	> 100	?
Boala Huntington (1:12.000)	4p16.3	AD (anticipație)	CAG	Regiune codantă	6-28	29-37	> 38	patern

$(CGG)_n$ – cea mai frecventă formă de retard mental ereditar; boala Huntington – produsă de repetiția $(CAG)_n$ – una dintre cele mai frecvente boli ereditare; distrofia miotonică – produsă de repetiția $(CTG)_n$ – o formă frecventă de distrofie musculară; ataxia Friederich – produsă de repetiția $(GAA)_n$ – cea mai frecventă ataxie ereditară în populația caucaziană. Vom prezenta aceste boli în capitolul 12, dar acum vom face doar câteva precizări privind caracteristicile generale și mecanismele patogenice.

Bolile produse prin expansiunea repetițiilor nucleotidice sunt *heterogene* prin:

- mărimea diferită a unității repetate, cel mai frecvent RTN;
- localizarea diferită a RTN în structura genei afectate, fie în regiunile codante (exoni), fie în regiunile necodante: promotor, în regiunile netranslate 5' sau 3' UTR sau introni;
- gradul diferit al expansiunilor, mai mici sau mai mari;
- mecanisme patogenice diferite: *pierderea funcției genei* (prin hipermetilare și represie, ca în cazul genei *FMR1*) sau *câștig de funcție* (prin proteine anormale sau ARN toxic).

Din punct de vedere patogenic se deosebesc două mari categorii (stabilite pe bazele unor caracteristici similare): boli prin expansiunea RTN în regiunile codante și boli prin expansiunea RTN în regiunile necodante.

- *Bolile prin expansiunea repetiției trinucleotidice în regiunile codante* pot fi grupate în boli cu expansiunea de repetiții (CAG)n ce codifică glutamina (*boli poli-Q;* ele sunt afecțiuni neurodegenerative, cele mai frecvente fiind boala Huntington și diferite forme de ataxii spino-cerebeloase) și boli cu expansiunea de repetiții (GCN)n ce codifică alanina (*boli poli-A;* ele sunt boli cu manifestări clinice variate) (vezi subcapitolul 12.C).
- *Bolile prin expansiunea unor repetiții trinucleotidice în regiunile necodante* (numite și boli non-poli Q) sunt reprezentate, în special, de sindromul X fragil, distrofiile miotonice 1 și 2 și boala Friederich. În acest grup se includ și unele boli produse prin repetiții particulare: repetiții tetra- și pentanucleotidice sau amplificarea unui VNTR de 45 perechi de baze

Multe din bolile prin expansiunea repetițiilor nucleotidice au în comun un element principal **anticipația**: în succesiunea generațiilor vârsta de debut este mai mică și/sau severitatea bolii mai mare datorită expansiunii succesive a RTN (vezi subcapitolul 6.D.3 și figura 6.33). *Intensitatea de manifestare a bolii* la descendenți este proporțională cu *dimensiunile* secvenței amplificate și depinde uneori de *sexul părintelui* prin care se face transmiterea: în sindromul X fragil și distrofia miotonică boala este mai gravă dacă transmiterea se face de către mamă, în timp ce în boala Huntington gravitatea formei clinice este mai mare când boala este transmisă de către tată. Mecanismul acestui „**efect parental**" nu este încă precis cunoscut; foarte probabil aceasta reflectă o supraviețuire diferită a gameților ce poartă o expansiune mare și au o tendință de expansiune mai mare la un sex decât la altul.

BCU CLUJ / BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

1.5. Mecanisme rare

- Genomul uman conține un număr mare de secvențe repetitive *dispersate*, în special secvențe scurte (300 pb) de tip *Alu*, din familia SINE, sau secvențe mai lungi (3-7 Kb) din familia LINE, derivate din retrotranspozoni (vezi capitolul 3.C.3.3). Unele secvențe pot fi active și sunt capabile de transpoziție printr-un ARN intermediar, inserându-se aleatoriu în genom. Dacă inserția se face în exoni, atunci se întrerupe secvența ce codifică o proteină; dacă inserția se face în introni, poate fi afectată matisarea lor. Astfel, s-au descris cazuri de hemofilie A, distrofie musculară Duchenne, polipoză de colon produse prin inserția unei repetiții LINE 1 sau cazuri de neurofibromatoză 1 cauzate de inserția unui element transpozabil activ *Alu*. Mecanismul de *mutageneză inserțională* pare, din fericire, puțin activ la om.
- Rearanjările cromozomiale, de tipul translocațiilor reciproce echilibrate, care au punctul de ruptură în interiorul unei gene pot produce inactivarea ei. Acest mecanism este foarte rar, dar important pentru localizarea foarte precisă și clonarea genei implicate.

2. Consecințele genotipice și fenotipice ale mutațiilor genice

Consecințele mutațiilor genice asupra genotipului și expresiei sale fenotipice sunt complexe și dependente de factori multipli. Analiza este dificilă, datorită volumului mare de informații, iar prezentarea lor nu poate fi decât sintetică și schematică.

2.1. Mutații în genomul nuclear și mitocondrial

Cele mai multe mutații genice afectează *genomul nuclear* și, din acesta, ADN extragenic, ce reprezintă imensa majoritate a genomului. Se produce astfel un foarte amplu *polimorfism al ADN*, care însă nu are de obicei consecințe fenotipice. În felul acesta, marea majoritate a mutațiilor nu au efecte asupra individului și se poate spune că „soluția imensității ADN extragenic necodant" este benefică pentru evoluție. Din fericire, aceasta nu este unica „soluție de protecție" din natură: să ne amintim de existența ADN necodant din structura genelor, precum și de mutațiile sinonime („silențioase") sau de cele conservative (vezi secțiunea 7.B.1.1). Practic, numai anumite alterări în structura și expresia genică vor fi implicate în producerea unor boli, dar despre acestea vom discuta în secțiunea următoare.

Genomul mitocondrial reprezintă circa 1:200.000 din mărimea genomului nuclear. ADNmt se găsește în mii de copii în fiecare celulă somatică; dacă se produce o mutație într-o singură moleculă de ADNmt, se poate presupune că șansa „fixării" ei va fi foarte mică și deci rata mutațiilor mitocondriale cu efect patogen va fi foarte mică. Totuși, frecvența bolilor mitocondriale este suficient de mare pentru a considera genomul mitocondrial o țintă preferată („un punct fierbinte") a mutațiilor. Acest paradox se poate explica prin:

- procentajul foarte mare al regiunilor codante din ADNmt (93% *față de* 3% în genomul nuclear), ceea ce face ca, statistic, probabilitatea unei mutații de a determina un efect funcțional să fie mai mare decât în cazul ADN nuclear;
- rata foarte înaltă a mutațiilor la nivelul ADNmt, datorată, pe de o parte, producerii de numeroase leziuni prin acțiunea combinată a „bombardamentului" continuu al ADNmt, neprotejat de către histone, de către speciile reactive de oxigen (produse de catena respiratorie din mitocondrii) și a erorilor de replicare produse în decursul unui număr de runde de replicare ale ADNmt comparativ mai mare cu cel al ADN-ul cromozomial, și, pe de altă parte, a numărului redus și a eficacității diminuate ale sistemelor de reparare a leziunilor ADNmt;
- rata foarte mare de fixare a mutațiilor în ADNmt.

2.2. Consecințele mutațiilor asupra informației și expresiei genice

Consecințele genotipice ale mutațiilor genice depind în principal de *tipul* și *localizarea mutațiilor* în structura genei.

a) Efectul tipului de mutație

Efectul tipului de mutație – *microleziuni* (substituții, deleții și inserții nucleotidice mici) sau *macroleziuni*/remanieri genice (deleții, duplicații, inserții, inversii etc.) – asupra informației genice a fost discutat în secțiunea anterioară. Fără a reveni, vom reaminti că substituțiile se produc cel mai frecvent în secvențele codante, determinând prin mutații nesinonime modificări ale secvenței de aminoacizi a proteinelor, iar delețiile și inserțiile mici (non-multiplu de trei) produc decalarea cadrului de lectură și o proteină complet anormală. Remanierile genice importante determină o perturbare a expresiei genice, afectând transcripția, procesarea ARNm, translația sau stabilitatea proteinelor.

b) Efectul localizării intragenice a mutației

Orice componentă din structura genei (vezi capitolul 3.B.1) poate fi afectată de mutații (figura 7.6). În funcție de localizarea intragenică, vom deosebi trei categorii principale de mutații:

- *mutații în regiunile codante* – determină sinteza unei proteine cu o structură anormală a cărei funcție va fi de obicei redusă sau abolită, mai rar crescută sau modificată (diferită de funcția inițială);
- *mutațiile care afectează matisarea ARNm precursor sau stabilitatea ARNm matur* – produc, în funcție de mecanism, fie o proteină anormală, fie o modificare a cantității de proteină normală sintetizată;
- *mutațiile care afectează dozajul genic (deleții, duplicații) sau reglarea procesului de transcripție* – determină scăderea sau creșterea sintezei proteice, mai rar o expresie inadecvată ca timp și spațiu.

În esență, mutațiile – în diferite regiuni din structura genei – produc fie o modificare a structurii proteinei, fie o perturbare a diferitelor etape ale expresiei genice (la nivelul transcripției, procesării și maturării ARNm precursor, al translației sau stabilității proteinei).

(1) *Transcripția*

Mutațiile pot afecta transcripția alterând elemente diferite necesare reglării acestui proces.

- Secvențele regiunii promotor (de exemplu, ale genei codante pentru b-globină) pot fi modificate de mutații diverse care vor altera legarea factorilor de transcripție; în acest context, vom sublinia că există și mutații ale genelor ce codifică factori de transcripție, deseori letale sau care produc anomalii de dezvoltare.
- Secvențele 5'UTR sau 3'UTR transcrise, dar netranslate, din primul și ultimul exon ai genei, pot suferi mutații ce modifică rata sintezei proteice. Au fost descrise mutații ale secvenței *5'UTR* în gena pentru factorul IX, ce produc hemofilia B Leyden, și în gena *FMR1*, care determină sindromul X-fragil, sau ale secvenței 3'UTR în gena *DMPK*, ce produc boala Steinert.

(2) *Maturarea ARN precursor în ARNm*

Mutațiile pot afecta matisarea și poliadenilarea ARNm precursor (vezi capitolul 4.B.2.b).

- Alterarea (prin substituție) a situsurilor de decupare ale intronilor[5] – situsul donor (5'-GT) sau acceptor (AG-3') – face ca excizia să se producă la următorul exon și astfel se va încorpora în ARNm matur o parte sau întregul intron ori va lipsi un exon[6] (în funcție de situsul afectat). Ambele situații au consecințe importante asupra expresiei genei (ARNm instabil; polipeptid nefuncțional).
- Activarea prin mutație a unui situs criptic de decupare (dintr-un exon sau intron) va antrena o competiție cu situsurile normale în cursul procesului de maturare a ARNm; aceste mutații pot produce o proteină trunchiată cu activitate funcțională nulă sau foarte redusă (în funcție de exonul afectat) sau vor bloca transcripția (când se produc în introni).

(3) *Translația ARNm în proteină*

- Mutațiile codonului inițiator, mutațiile cu decalarea cadrului de lectură (*frameshift*) sau mutațiile nonsens determină, de regulă, absența formării proteinei codificate de gena ce a fost modificată sau producerea unei proteine trunchiate.
- Mutațiile cu sens greșit modifică semnificația unui codon și consecințele lor sunt variabile după natura schimbării și amplasarea în proteină a aminoacidului modificat. Mutațiile *nesinonime* pot afecta stabilitatea proteinei, localizarea intracelulară, maturarea proteinei, asamblarea ei în structuri multimerice, interacțiunile cu liganzii sau alte proteine, situsul funcțional pentru activitatea enzimatică etc. Mutațiile *sinonime* (sau neutre) sunt însă fără efect (exceptând situațiile de activare a unui situs criptic de matisare).
- Mutațiile în codonul stop vor duce la încorporarea adițională de aminoacizi în proteină, care poate deveni instabilă.

2.3. *Efectul fenotipic al mutațiilor patogene*

Alterând funcția unei proteine, mutațiile pot avea consecințe patologice majore, astăzi fiind unanim recunoscute ca reprezentând *cauze frecvente de boală sau de predispoziție la îmbolnăvire*. Pentru patologia moleculară cel mai important lucru nu este secvența unei alele mutante (utilă pentru diagnosticul genetic) ci efectul ei fenotipic.

Efectul fenotipic al mutațiilor patogene depinde de mai mulți factori:

- efectul mutațiilor asupra funcției proteinei; în esență, este vorba de *pierderea* și *câștigul* de funcție, dar aceste aspecte sunt mai complexe și vor fi nuanțate și detaliate ulterior;
- *tipul și funcția proteinei*: enzimă, proteină structurală, receptor membranar, canal ionic etc.;
- *gradul în care fenotipul anormal va fi exprimat* la heterozigoți; în bolile recesive, prezența unei alele normale la heterozigoții *N/a* este suficientă

5. În engleză se numesc *splice site mutations*.
6. În engleză se numește *exon skipping*

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

pentru menținerea unei stări normale; în unele boli dominante, heterozigoții *A/n* au un fenotip mai puțin sever comparativ cu homozigoții *A/A*;
- *gradul în care expresia genei* mutante va fi influențată de alte *gene modificatoare* ce generează un fond genetic diferit la persoane diferite;
- *natura celulelor* (germinale sau somatice) și proporția de celule (în mozaicurile somatice) care au gena mutantă; mutațiile moștenite de la părinți, prin gameți, sunt prezente în toate celulele unui individ; mutațiile somatice vor avea efecte dependente de momentul ontogenetic în care se produc și, în consecință, de proporția celulelor ce formează clona anormală;
- *originea parentală* a mutațiilor, în cazul genelor amprentate.

Asupra unora dintre acești factori, ce influențează în esență ereditatea monogenică, ne-am referit în capitolul anterior și vom reveni cu detalii și exemple în capitolul 12.A. Considerăm totuși utile pentru înțelegerea efectelor mutațiilor câteva precizări sintetice despre *efectul mutațiilor asupra funcției proteinei.*

Mutațiile patogene, cauzatoare de boală, pot avea, în funcție de tipul și mecanismul de acțiune, două tipuri majore de efecte asupra funcției proteinei codificate de gena care a suferit mutația: pierderea funcției sau câștigul de funcție.

(1) Pierderea funcției. Numeroase tipuri de mutații pot produce o pierdere totală sau parțială a expresiei genei și deci a activității normale a proteinei. Aceste mutații sunt la originea majorității bolilor cu transmitere recesivă, care se manifestă la homozigoți sau heterozigoți compuși (ambele alele sunt modificate). Ele se pot găsi și în unele boli cu transmitere dominantă prin fenomenele de *haploinsuficiență* sau **dominanță negativă.** În haploinsuficiență se produce, la heterozigoți, o pierdere de 50% a nivelului normal al proteinei nivel insuficient pentru a asigura funcția normală. Așa se explică de ce în hipercolesterolemia familială, boala apare la heterozigoți dar este mult mai puțin severă decât la homozigoți. În cazul dominanței negative se produce o interferență funcțională între produsul alelei mutante și cel al alelei normale, rezultând complexe proteice dimerice sau multimerice nefuncționale (de exemplu, genele *COL1A1* sau *COL1A2* ale colagenului). Ambele fenomene vor fi descrise pe larg în capitolul 12.

(2) Câștigul de funcție. Mutațiile asociate cu un câștig de funcție (numite uneori și *mutații activatoare*) pot acționa prin mecanisme multiple.
- *Creșterea nivelului funcțional*, fie prin creșterea nivelului de expresie a proteinei mutante (de exemplu, prin creșterea dozajului genic), fie prin creșterea abilității proteinei de a-și efectua funcția normală (de exemplu, activarea permanentă a unui receptor în absența ligandului sau deschiderea permanentă a unui canal ionic).
- *Achiziția unor proprietăți noi de către proteina mutantă*, prin mecanisme diverse:
  - modificarea proprietăților structurale ale proteinei ce tinde să polimerizeze și să *precipite* (de exemplu, hemoglobina S în sicklemie) sau să producă *agregate toxice* (de exemplu, proteinele cu expansiune poliglutaminică în boala Huntington);
  - achiziția unei *funcții noi* (varianta a1-antitripsină Pittsburg nu mai acționează ca o anti-elastază, ci ca un puternic inhibitor al factorilor de coagulare);
  - producția unei *proteine toxice* (gena ce codifică precursorul peptidului pentru b-amiloid și produce forme precoce de boală Alzheimer);
- *Expresia inadecvată a genei* fie ca timp (*expresie heterocronică*), fie ca loc (*expresie ectopică*), fie ambele. În această categorie se încadrează *persistența ereditară a hemoglobinei fetale* sau expresia inadecvată a *oncogenelor* în celule în care aceste gene nu sunt normal exprimate.

Menționăm, în final, că mutațiile diferite în aceeași genă care vor duce la pierdere de funcție sau la câștig de funcție vor determina fenotipuri diferite. Un exemplu sugestiv este reprezentat de mutații diferite în gena *RET* (11q12) (ce codifică un receptor cu activitate tirozin kinază, implicat în migrarea celulelor din creasta neurală): unele mutații produc o pierdere de funcție și determină *boala Hirschprung*; altele produc un câștig de funcție și conduc la trei forme de cancer ereditar al glandelor tiroidă și suprarenală (neoplaziile endocrine multiple *MEN2A* și *MEN2B*) precum și *cancer medular tiroidian.*

2.4. Corelații dintre genotip și fenotip

Studiul mutațiilor patogene cauzatoare de boală a dus la o mai bună înțelegere a relațiilor dintre genotip și fenotip în bolile genetice. Desigur, relația clasică „*o genă → un caracter → boală*", ce stă la baza eredității monogenice, rămâne valabilă pentru multe boli, dar aceasta nu este singura corelație posibilă între genotip și fenotip. Cu riscul de a reveni asupra unor aspecte discutate, dar pentru a asigura o înțelegere completă a problemei, vom preciza aceste posibile corelații.

O genă → o boală. Multe afecțiuni monogenice sunt produse de mutația unei anumite gene. Totul

pare simplu şi clar. În realitate, posibilităţile actuale de analiză a genei şi, implicit, de identificare a mutaţiilor au arătat că lucrurile nu sunt simple, iar problema corelaţiei genotip-fenotip este destul de complexă. În unele boli (sicklemie, boala Huntington ş.a.), *mutaţia este unică*, deoarece produce maladia printr-o modificare funcţională foarte precisă a proteinei sau a expresiei genei. În alte afecţiuni, o anumită mutaţie este *preponderentă*, datorită unui „punct fierbinte" din structura genei ce determină recurenţa mutaţiei (inversia – în hemofilia A, deleţia – în amiotrofia spinală, expansiunea trinucleotidică – în sindromul X fragil etc.) sau datorită *efectului de fondator*. În numeroasele boli produse prin pierderea funcţiei unei proteine, *heterogenitatea mutaţiilor* este aproape regula (de exemplu, mai mult de 130 de mutaţii în β-talasemie şi peste 600 în fibroza chistică). Spectrul mutaţiilor reflectă sensibilitatea genei la diferite mecanisme mutaţionale, iar corelaţia dintre anumite mutaţii şi anumite manifestări clinice rămâne a fi definită în viitor.

O genă → mai multe boli. Există numeroase exemple care demonstrează că mutaţii produse într-o singură genă determină boli distincte, diferite. Citâm câteva exemple:

- mutaţiile genei pentru *beta-globină* (pe cromozomul 11pter) produc sicklemia (AR), β-talasemia (AR), methemoglobinopatia (AD) şi o hemoglobină instabilă (AD);
- gena *LICAM* (pe cromozomul Xq28) prezintă mutaţii în hidrocefalia prin stenoza apeductului Sylvius, sindromul MASA (*mental retardation, aphasia, shuffing gait, adducted thumbs* = retard mental, afazie, mers „târşâit" – spastic – şi adducţia policelor) şi paraplegia spastică tip 1;
- gena *COL1A2* este implicată în patru forme diferite clinic de *osteogenesis imperfecta* şi în sindromul Ehlers-Danlos tipul VII B;
- mutaţiile genei *FGFR2* (*receptorul 2 al factorului de creştere fibroblastică*) produc trei sindroame diferite cu craniostenoză, numite Crouzon, Pfeiffer şi Jackson-Wiess.
- mutaţiile în gena *AR (receptorul pentru androgeni)* pot produce, prin pierdere de funcţie, sindromul de testicululuui feminzant (o formă de pseudohermafroditism masculin) sau prin câştig de funcţie, atrofia musculară spino-bulbară.

Mai multe gene → o boală. Este vorba de *heterogenitatea non-alelică* de locus, în care mutaţii în gene diferite se manifestă fenotipic identic sau foarte asemănător (de exemplu retinita pigmentară); în capitolul 4.A.5 am discutat mai multe exemple, precum şi importanţa practică a acestui fenomen relativ frecvent.

Ereditatea digenică – două gene pentru un fenotip (vezi şi subcapitolul 6.E.2). Boala apare prin mutaţii concomitente în două gene nealele; de exemplu, o formă de *retinită pigmentară* este produsă numai dacă există concomitent mutaţii în gena *RDS* (pe cromozomul 6p) şi în gena *ROM* (pe cromozomul 11q).

O mutaţie nu determină totdeauna acelaşi fenotip. Fenotipul produs de o mutaţie poate fi influenţat de acţiunea altor gene (de exemplu, o aceeaşi mutaţie – C342R – în gena *FGFR2* poate produce sindromul Crouzon sau sindromul Pfeiffer) sau de factori de mediu (de exemplu, mutaţia în gena *PAH* poate produce, prin deficienţa de fenilalanin-hidroxilază, fenilcetonuria, cu retard mental sever, sau poate rămâne fără efect, dacă bolnavii sunt depistaţi la naştere şi primesc o dietă fără fenilalanină).

Mutaţii în aceeaşi genă pot produce forme dominante sau recesive ale bolii. Deficienţa în factorul von Willebrand este o tulburare a coagulării sângelui relativ frecventă (vezi capitolul 12.E). Unele mutaţii (deleţii, nonsens, *frameshift*) în gena *VWF* (pe cromozomul 12p) produc o formă de boală cu transmitere recesiv autozomală, iar alte mutaţii (mai ales substituţii cu sens greşit) determină forme dominante.

3. Cauzele şi frecvenţa mutaţiilor genice

Mutaţiile genice se pot produce spontan, natural, cel mai frecvent prin erori accidentale în cursul replicării, sau pot fi induse de agenţi exogeni sau endogeni, numiţi mutageni. Aceste cauze – *spontane* sau *induse* – generează multiple şi frecvente leziuni ale ADN, care au un potenţial nociv major asupra informaţiei ereditare. Din fericire, există în organism *mecanisme eficace de reparare* care reduc substanţial efectul defavorabil al mutaţiilor.

3.1. Mutaţii spontane

Schematic, se pot deosebi două mecanisme de generare a mutaţiilor spontane:

(1) Cea mai importantă sursă de leziuni ale ADN o reprezintă însuşi *procesele de replicare şi recombinare*. În cursul replicării semiconservative (vezi capitolul 6.A.1), fiecare catenă a ADN „parental" serveşte ca matriţă pentru sinteza unei noi catene; acest proces, efectuat de polimeraze, implică recunoaşterea unei baze din catena matriţă şi

adăugarea complementară a unui nucleotid la capătul 3' al catenei ce se sintetizează. ADN-polimerazele δ şi ε catalizează împerecherea corectă a A cu T şi a G cu C, făcând rareori erori. Totuşi, datorită unui fenomen de *tautomerie* (ce implică deplasarea unui atom de hidrogen din nucleotid), acestea pot forma structuri alternative ce fac ca bazele să se împerecheze greşit (*mismatch*). ADN-polimerazele corectează în mare măsură aceste erori. Erorile rămase necorectate sunt mai rare în cazul ADN-polimerazei δ şi ε, principalele polimeraze implicată în replicarea ADN-ului, dar relativ frecvente în cazul altor polimeraze. Pe ansamblu, erorile care rezultă în urma procesului de replicare au o frecvenţă de aproximativ 50.000/genom/zi. Dar organismul uman posedă alte sisteme de reparare ce determină ca rata erorilor de împerechere apărute în cursul unei runde de replicare să fie extrem de redusă, de circa o încorporare greşită la 10^9-10^{10} nucleotide.

(2) Există leziuni ce pot să apară spontan, în *condiţii fiziologice*, în absenţa replicării. De exemplu, hidroliza reziduurilor nucleotidice poate să conducă la *situsuri abazice*, fenomen ce poate fi favorizat de temperaturi crescute şi de acidifierea mediului celular. *Dezaminarea spontană* a citozinei, adeninei, guaninei sau 5-metilcitozinei poate conduce la formarea uracilului, hipoxantinei, xantinei şi, respectiv, a timinei.

3.2. Mutaţiile induse

Mutaţiile induse sunt determinate de agenţi mutageni externi sau interni, fizici sau chimici.

(1) *Factorii de mediu extern*, precum radiaţiile ultraviolete (UV) – componentă a radiaţiei solare, radiaţiile ionizante şi numeroşi agenţi chimici genotoxici pot cauza diverse alterări în structura ADN (tabelul 7.4) care, lăsate nereparate, pot conduce la apariţia mutaţiilor. Pe primul loc ca frecvenţă în această categorie se află **radiaţiile ultraviolete** solare, ce produc dimeri pirimidinici. Din punctul de vedere al consecinţelor, hidrocarburile policiclice din *fumul de ţigară* sunt însă cel mai important agent mutagen exogen, acesta fiind responsabil de producerea mai multor decese prin cancer decât orice alt agent exogen cunoscut. Hidrocarburi policiclice se găsesc însă şi în produşii de combustie; lor li se adaugă agenţi alchilanţi/metilanţi, ce poluează atmosfera, gudroanele de ulei, medicamente antitumorale, aflatoxinele, diverse minerale sau metale. **Radiaţiile ionizante** (raze X sau raze gama) induc în special rupturi mono- sau bicatenare ale ADN. La om, radiaţiile ionizante – din surse naturale, profesionale, medicale sau accidentale – au probabil consecinţe genetice mici (caseta 7.3) (datorită eficacităţii mecanismelor de reparare ale leziunilor), reprezentate cel mai adesea sub formă de mutaţii recesive ce se vor manifesta numai dacă se întâlnesc doi heterozigoţi cu o mutaţie identică. Organismele internaţionale au definit o limită arbitrară de siguranţă – mai mică decât cea care ar produce un efect semnificativ asupra frecvenţei mutaţiilor dăunătoare în populaţie – recomandând ca expunerea profesională să nu depăşească 15-50 mSv pe an.

(2) Deşi agenţii externi sunt mai bine studiaţi, cele mai multe leziuni ale ADN sunt produse de către diferite *agresiuni endogene*, cum ar fi *depurinarea* (circa 5.000 leziuni/genom/zi), *dezaminarea citozinei* (circa 100 leziuni/genom/zi), *alterarea oxidativă* (atacul speciile reactive de oxigen la nivelul inelelor purinic şi pirimidinic, 20.000 leziuni/genom/zi), *metilarea nonenzimatică* (600 leziuni/genom/zi).

3.3. Frecvenţa mutaţiilor genice

Rata mutaţiilor unei gene se exprimă de obicei ca număr de mutaţii noi per locus per generaţie şi se evaluează prin determinarea incidenţei unor cazuri sporadice, noi, ale unor boli autozomal dominante (cu penetranţă completă) sau recesive legate de X, care

Tabelul 7.4. Tipuri de leziuni ale ADN şi agenţii etiologici ale acestora

Tipul de leziune a ADN	Agentul etiologic
Erori de împerechere	Erori ale replicării
Situsuri abazice	Erori ale replicării spontane
Dezaminări	Spontan
Alchilări	Agenţi metilanţi (S-adenozil metionina)
Baze oxidate sau hidroxilate	UV-A, radicali ai oxigenului, radiaţii X, produşi ai peroxidării lipidelor
Dimeri pirimidinici	UV-B (> 320 nm)
Adiţia unor radicali chimici	Carcinogeni (atmosferici, alimentari, fum de ţigară), citostatice
Legături încrucişate intracatenare sau cu proteinele	Carcinogeni, citostatice
Legături încrucişate intercatenare	Mitomicina C, cisplatinul
Rupturi monocatenare	Radiaţii X, inhibitori ai topoizomerazei I, radicali ai oxigenului
Rupturi bicatenare	Radiaţii gama, inhibitori ai topoizomerazei II

CASETA 7.3

Radiațiile ionizante

Radiațiile ionizante includ undele electromagnetice cu lungime de undă foarte mică (razele gama și razele-X), precum și particulele cu energie înaltă (particule alfa, beta și neutroni). Razele-X, razele gama și neutronii au putere mare de pătrundere comparativ cu particulele alfa și beta (numai câțiva milimetri). Cantitatea de radiații primită pe unitatea de țesut iradiat se numește doză de radiații și este măsurată în doză absorbită de radiații sau ***rad*** *(„radiation absorbed dose"). Oamenii pot fi expuși la un amestec de radiații, și atunci se folosește o unitate convențională,* ***rem*** *(„roentgen equivalent for man"), pentru a măsura orice radiație în termeni de raze-X. Un rem de radiație este acea doză absorbită care produce într-un țesut dat același efect biologic ca 1 rad de raze-X. Un milirem (mrem) este a mia parte dintr-un rem. 100 rem echivalează cu 1 sievert (Sv), iar 100 razi, cu 1 gray (Gy); pentru practică, sievert și gray sunt aproximativ egale.*

Potrivit unei concepții mai vechi, bazate pe studii experimentale, orice iradiere produce mutații (nu există prag sub care iradierea să nu aibă efect), iar numărul de mutații produse de radiații crește proporțional cu doza, efectele genetice fiind cumulative. Studii recente par să infirme conceptul lipsei de prag, relevând că dozele mici stimulează activitatea mecanismelor de reparare ale ADN.

Sursele de radiații la care este expus omul sunt naturale (radiații cosmice, materiale radioactive) și artificiale (radiologie diagnostică sau terapeutică, expunere profesională, expunere accidentală), iar doza medie de radiații primită pe gonade din diferite surse este apreciată la 2,4 mSv pe an și 72 mSv pentru 30 de ani (perioada reproductivă).

La om, efectele genetice ale radiațiilor sunt greu de studiat, deoarece ele nu sunt manifeste la generația expusă, ci numai la generațiile următoare, și aceasta în funcție de tipul de mutație: dominantă, recesivă sau legată de X. Studiile ample efectuate la supraviețuitorii bombardamentelor atomice din Japonia au arătat că nu există diferențe semnificative ale nou-născuților morți, ale malformațiilor congenitale, ale deceselor neonatale, ale raportului frecvenței mutațiilor între sexe (pentru mutații letale legate de X), ale cancerelor înainte de vârsta de 20 de ani – la urmașii părinților expuși (la o doză de 30-60 remi) comparativ cu descendenții unui lot-martor neexpus la radiații atomice. Rezultate similare au fost obținute și prin analiza efectelor iradierii medicale. În ceea ce privește iradierea profesională, mai ales în centralele nucleare, s-a descris o creștere semnificativă a numărului de copii cu leucemie din tați ce lucrează în aceste unități, posibil prin inducerea de mutații în celulele lor germinale. Alte cercetări nu au reușit totuși să ateste efectele leucemogene ale iradierii paterne. Și datele privind iradierea accidentală sunt contradictorii. Un studiu efectuat asupra persoanelor expuse la radiații după accidentul de la centrala nucleară de la Cernobîl indică o creștere de două ori a ratei mutațiilor germinale. Este însă dificil să se compare aceste date cu rezultatele studiilor japoneze, deoarece tipul de radiații este oarecum diferit, lotul studiat la Cernobîl este mic (79 de familii), iar grupul-martor era din populația britanică. În concluzie, încercările de a demonstra că radiațiile produc alterări genetice la om nu au fost foarte convingătoare. Aceasta nu înseamnă că radiațiile ionizante nu au consecințe genetice, ci numai că acestea sunt probabil mici (mecanismele de reparare ale leziunilor sunt destul de eficace) și cel mai adesea sub formă de mutații recesive ce se vor manifesta numai dacă se întâlnesc doi heterozigoți cu o mutație identică.

au o expresie clinică ușor de recunoscut (de exemplu, acondroplazia, aniridia, hemofilia, distrofia musculară Duchenne ș.a.). Determinările pentru diferite afecțiuni au permis estimarea unor valori ale ratelor mutațiilor germinale cuprinse între 10^{-4} și 10^{-7} mutații per locus/per generație, cu o frecvență medie de $1:10^{-6}$. Aceasta înseamnă că cel puțin *una din 20 de persoane a primit de la unul dintre părinți o genă mutantă nouă.*

Mutațiile noi se pot produce în spermatogeneză sau ovogeneză, în cursul diviziunilor mitotice sau meiotice ale celulelor germinale. Există însă diferențe importante între cele două sexe privind *timpul de producere* și *numărul de diviziuni celulare pe care le suferă celulele sexuale.*

În *ovogeneză*, fiecare gamet este rezultatul a 22 de diviziuni mitotice și al unei diviziuni meiotice (23 de diviziuni) ce se produc în cursul vieții fetale; după cum știm deja (vezi capitolul 6.C.1), meioza I se oprește înainte de naștere, rămâne astfel „suspendată" un timp îndelungat și este reluată numai după ovulație. Cu cât ovocitele rămân mai multă vreme în meioza I (și deci vârsta reproductivă maternă este mai mare), cu atât mai mult crește riscul nedisjuncției meiotice. În *spermatogeneză*, producția de gameți se face până

la vârste avansate, fiecare spermatozoid rezultând, în medie, după 200 de diviziuni, iar acest număr creşte cu vârsta. Explicaţia este următoarea: spermatogoniile suşă se formează până la pubertate, prin circa 30 de mitoze; apoi, sunt necesare 5 diviziuni pentru fiecare ciclu de spermatogeneză, ce durează 16 zile (deci 23 de cicluri pe an). Astfel, numărul de diviziuni necesare pentru formarea unui spermatozoid se calculează după formula următoare: 30+23n+5, în care n = vârsta în ani – 15 (vârsta pubertăţii). La o frecvenţă de 10^{-10} erori de replicare per genom per diviziune, fiecare spermatozoid al adultului va conţine câteva sute de mutaţii noi produse prin acest mecanism. Deşi marea lor majoritate nu vor avea efecte fenotipice aparente (fiind localizate în regiuni fără rol funcţional), se estimează că o mică proporţie de spermatozoizi (circa 1 din 10) va avea o mutaţie patogenă.

Rezultă, logic, că frecvenţa *neomutaţiilor* paterne produse prin erori de replicare a ADN ar trebui să fie mai mare decât a neomutaţiilor materne şi să crească odată cu vârsta tatălui, fapt observat în anumite boli, ca *neurofibromatoza*, *acondroplazia* sau *hemofilia B* (la bunicul matern al bolnavului). Acest fenomen este amplificat de faptul că metilarea citozinei în dimerul CpG este mai frecventă în celulele germinale masculine, determinând transversiile de tip C → T sau G → A.

Astfel, mutaţiile *FGFR2* (receptorul tip 2 al factorului de creştere fibroblastică) – responsabile de *sindromul Apert* (o craniostenoză asociată cu polisindactilie) – sunt toate de origine paternă. Mai mult, unele remanieri genice (inversia genei ce codifică factorul VII al coagulării sau deleţia/duplicaţia genei *PMP22*, discutate mai sus) se produc, din motive necunoscute, exclusiv în celulele germinale masculine.

Diferenţele de sex în producerea unor mutaţii se observă pregnant şi în unele boli prin *expansiunea repetiţiilor trinucleotidice*. Astfel, expansiunea amplă a repetiţiei CAG, ce produce formele juvenile de boală Huntington, este în general de origine paternă. Dar expansiunea masivă a repetiţiei CGG în sindromul X fragil se produce aproape întotdeauna în timpul gametogenezei feminine. Aceste diferenţe pot exprima nu numai diferenţele fundamentale dintre ovogeneză şi spermatogeneză, ci şi o selecţie contra gameţilor ce poartă expansiunea repetiţiei.

Multe mutaţii se produc, firesc, şi în *celulele somatice* ce efectuează un număr mare de replicări şi diviziuni. Un organism uman adult are circa 10^{14} celule derivate din zigot prin 10^{15} diviziuni celulare; la o frecvenţă de 10^{-10} erori de replicare per genom per diviziune rezultă mii de mutaţii noi în genomul fiecărei celule. Dar consecinţele lor fenotipice depind de natura mutaţiei, de gena alterată şi de ţesutul implicat. Ele se întâlnesc frecvent în procesul de cancerogeneză şi constituie, foarte probabil, una dintre cauzele heterogenităţii expresiei clinice a unor boli ereditare. **Mozaicurile somatice** ar putea produce boli genetice numai dacă se produc precoce, în cursul dezvoltării embrionare. Cert este că mutaţiile somatice (non-germinale) nu se transmit generaţiilor viitoare.

4. Mecanismele reparării leziunilor ADN

Genomul uman suferă numeroase şi variate leziuni, spontane sau induse de agenţi externi sau interni. Totuşi, rata mutaţiilor este menţinută la un nivel scăzut prin intervenţia unor *sisteme de recunoaştere a leziunilor ADN şi de reparare enzimatică*[7], ce realizează fie o restituţie fidelă a structurii iniţiale, fie o reparare parţială, cu defect. Acţiunea acestor sisteme este corelată cu mecanismele ce coordonează progresia prin ciclul celular, tolerarea unor leziuni sau apoptoza. Nici unul dintre mecanismele de reparare a ADN nu are o eficienţă absolută, dar, în general, performanţa lor este ridicată. Existenţa unor boli umane asociate cu *defecte în repararea ale ADN*, multe dintre ele având o creştere a susceptibilităţii la cancer, demonstrează importanţa acestui proces de „control al calităţii ADN".

4.1. Mecanismele de reparare ale ADN nuclear

a) Repararea erorilor de împerechere din cursul replicării ADN

În momentul în care cele două catene ADN sunt separate, nucleotidele activate se poziţionează „spontan" şi pe bază de complementaritate pe întreaga porţiune a matriţei de ADN astfel expuse. Stoichiometria reacţiei de poziţionare pe bază de complementaritate permite împerecheri greşite (în special G-T) cu o probabilitate de 1 la 10.000. În plus, replicarea secvenţelor repetitive ale ADN se însoţeşte relativ frecvent cu fenomenul de „alunecare (glisare)" (*slippage*) a ADN-polimerazei, ceea ce conduce la formarea unor bucle de către una dintre catene cu alungirea (inserţia) sau scurtarea (deleţia) secvenţei repetitive (vezi figura 7.8). Rata mutaţiilor este însă mult mai mică datorită intervenţiei unor mecanisme ce asigură fidelitatea replicării şi păstrarea informaţiei ereditare.

7. În genomul uman au fost identificate circa 130 de gene ce codifică proteine implicate în sistemele de reparare.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

Un prim mecanism implică **ADN-polimerazele** care nu catalizează încorporarea pasivă a oricărui nucleotid ce este deja legat prin punți de hidrogen la catena matriță, ci discriminează activ împotriva unor împerecheri greșite, acestea producând distorsiuni ale dublului helix ADN. *Distorsiunile acționează ca semnal pentru îndepărtarea bazei inserate greșit.* Mecanismul crește acuratețea replicării de aproximativ 100 de ori, reducând rata așteptată a erorilor de la 10^{-4} la aproximativ 10^{-6}.

Un alt mecanism major răspunzător pentru acuratețea replicării ADN este activitatea de *autocorecție* (sau editare – de la *proofreading*) a ADN-polimerazelor. Ca un veritabil „editor", ADN-polimerazele *verifică dacă ultimul nucleotid* plasat la capătul 3'OH al catenei de ADN este „scris corect", deci dacă nu există o greșeală de împerechere. În cazul unei astfel de erori, ele pot să-l excizeze (datorită capacității exonucleazice 3'-5' pe care o posedă) și să-l înlocuiască cu nucleotidul corespunzător. O astfel de activitate, demonstrată pentru ADN-polimerazele δ și ε, permite creșterea acurateței replicării ADN-ului de circa 100-1.000 de ori.

În sfârșit, puținele erori de împerechere care apar totuși în ciuda intervenției mecanismelor mai sus amintite vor fi ținta unor mecanisme de **reparare ale erorilor de împerechere** (MMR, de la *mismatch repair*) ce intervin după replicare.

Sistemul MMR a fost descris inițial la *E. coli* cu fenotipul *mutator* (mut), ce determină o creștere a ratei mutațiilor spontane pentru toți locii din genomul bacteriei. La om, sistemul implică intervenția unor proteine speciale (proteine mutator) MSH2, MSH3 și MSH6 (sau GTBP) – ce recunosc erorile de replicare, precum și proteinele MLH1, PMS1 și PMS2 – care produc îndepărtarea lor.

Nucleotidele împerecheate greșit sunt *identificate* prin intermediul a două complexe: MSH2/MSH6 (GTBP), care recunoaște în special erorile de împerechere, și MSH2/MSH3, care recunoaște preferențial micile inserții/deleții. După recunoașterea erorii de împerechere, intervin complexele heterodimerice MLH1/PMS2 și MLH1/PMS1 ce interacționează cu complexele legate anterior. În continuare, procesul de reparare presupune *secționarea* și *degradarea exonucleazică* a unui fragment de ADN cu o lungime de peste 1-2 Kb (ce conține erorile de replicare), urmată de *refacerea secvenței normale*, sub acțiunea unor polimeraze.

Mutațiile genelor ce codifică proteinele implicate în calea MMR au drept consecință o boală genetică, relativ frecventă, numită *cancerul colorectal non-polipozic ereditar* (HNPCC), responsabilă de apariția a circa 5% dintre toate cazurile de cancer colorectal; boala se asociază cu un risc relativ crescut pentru dezvoltarea unor neoplazii maligne cu alte localizări.

Există câteva caracteristici ale neoplasmelor colorectale care apar în cadrul **HNPCC**: în proporție de 70% ele sunt localizate proximal de flexura splenică, există un exces de cancere mucinoase sau cu infiltrație limfocitară, iar evoluția pare a fi mai bună. Markerul principal al celulelor la pacienții cu HNPCC este **instabilitatea microsateliților** (secvențe di-, tri- sau tetranucleotidice înalt repetitive, dispersate în genom). În proporție de circa 60-70%, cazurile de HNPCC sunt determinate de mutații ale genelor *MLH1* și *MSH2*; un număr redus de cazuri este asociat cu mutații ale genelor *PMS1*, *PMS2* și *MSH6*.

b) Repararea bazelor modificate sau alterate după replicare

În afara erorilor ce se produc în timpul replicării, o altă sursă de mutații este modificarea chimică sau alterarea bazelor azotate[8] după replicare. Leziunile ADN-ului produse de agenți endogeni sunt îndepărtate de obicei prin mecanismul de *excizie a bazelor* (BER) modificate și, mai rar, prin *reparare directă* monoenzimatică (MGMT). Agenții mutageni exogeni pot produce distorsiunea dublului helix prin legături încrucișate intra- sau intercatenare; aceste alterări sunt îndepărtate prin *excizia nucleotidelor* (NER).

Mecanismele BER, NER și chiar MMR sunt variante ale unui mecanism general de **reparare prin excizie-resinteză**, care diferă prin ținta lor, prin modul de recunoaștere a leziunii și prin moleculele efectoare. Acest mecanism se realizează în mai multe etape (figura 7.18):

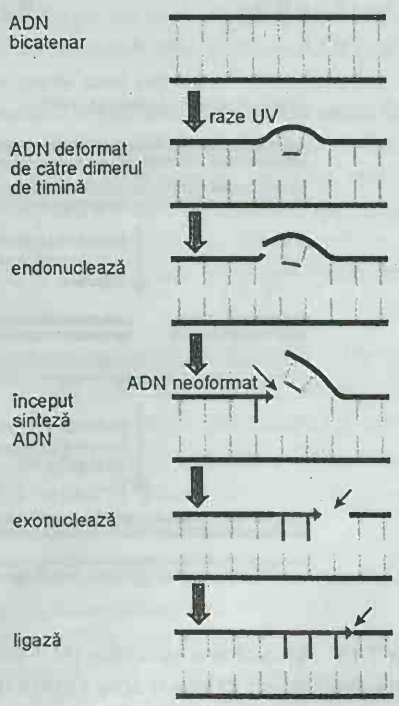


Figura 7.18. Mecanismul general de reparare al ADN prin excizie-resinteză

8. În fiecare celulă nucleată se produc zilnic circa 20.000 de alterări ale bazelor.

- recunoașterea situsului lezat (bază sau nucleotid) prin acțiunea unor *enzime specifice*;
- desfacerea dublului helix de către o *helicază*;
- excizia fragmentului de ADN alterat și a unui segment învecinat leziunii prin intervenția unor endonucleaze;
- îndepărtarea și degradarea fragmentului de către *exonucleaze*;
- resinteza componentelor breșei/lacunei (folosind ca matriță catena complementară de ADN) prin acțiunea unor *ADN-polimeraze*;
- realizarea, de către o *ADN-ligază*, a legăturii fosfodiester între fragmentul de ADN neosintetizat și capetele libere ale catenei de ADN.

(1) Repararea prin excizia bazei (*base excision repair – BER*). O bază modificată chimic (frecvent prin dezaminare spontană) este *îndepărtată* prin intermediul unor *ADN-glicozilaze*[9] ce clivează legătura glicozil dintre baza azotată și dezoxiriboză. Se creează astfel un *situs abazic* care este recunoscut de către *endonucleaza* APE1 (*apurinic/apyrimidinic endonuclease 1*), enzimă cu rol-cheie în calea de reparare BER la om; această enzimă clivează catena ADN pe flancul 5' al situsului abazic. Apoi intervine *polimeraza* β (figura 7.19.a) ce îndepărtează reziduul 5'-dezoxiribozo-fosfat (dRp), inserează nucleotidul

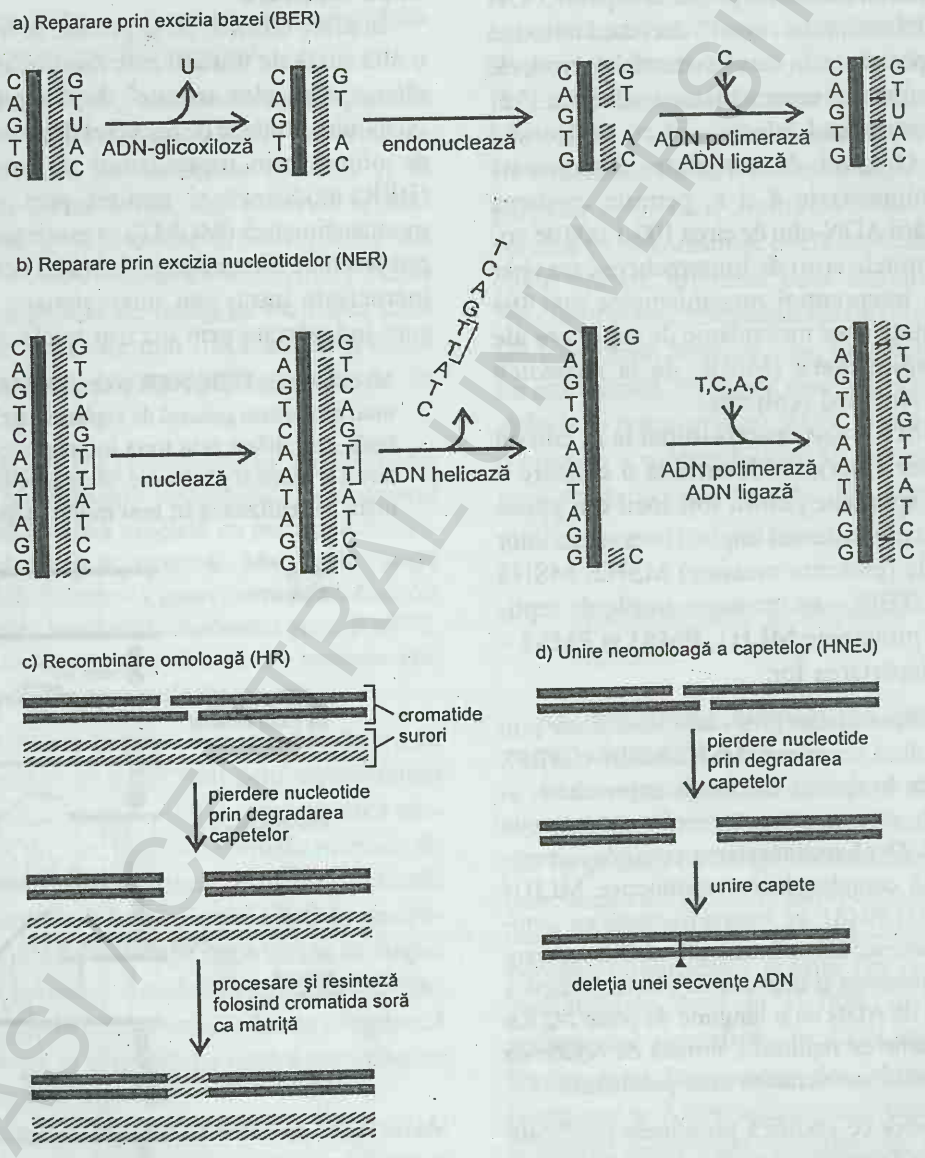


Figura 7.19. Mecanisme specifice de reparare a ADN. a) repararea prin excizia bazei; b) repararea prin excizia nucleotidelor; c) repararea rupturilor bicatenare ale ADN prin recombinare omoloagă; d) repararea rupturilor bicatenare ale ADN prin unirea neomoloagă a capetelor

(după Strachan și Read, 2010)

9. Cea mai abundentă dintre ADN-glicozilaze este *uracil ADN-glicozilaza* (UNG) care produce îndepărtarea reziduurilor de uracil ce rezultă prin dezaminarea citozinei.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

corespunzător catenei matriță și recrutează complexul *ligază 3 – XRCC1*, care va reface continuitatea catenei.

(2) Repararea directă monoenzimatică (*MGMT*). Prin intervenția unor cataboliți celulari reactivi se formează O^6-metilguanina. În acest caz, se produce o reparare directă, prin intervenția enzimei *metilguanin-metil-transferaza* (MGMT); aceasta transferă gruparea metil de la nivelul O^6-metilguaninei pe un reziduu propriu de cisteină formând 5-metilcisteina, o moleculă foarte stabilă ce inactivează enzima. Repararea sacrifică în întregime o moleculă proteică pentru fiecare leziune corectată. De aceea, acest mecanism de reparare este foarte rapid saturat atunci când organismul este supus unor agenți alchilanți exogeni.

(3) Repararea prin excizia nucleotidelor (*nucleotid excision repair – NER*). Calea de reparare NER este utilizată pentru corectarea diferitelor tipuri de leziuni ADN asociate cu *distorsiunea* structurii dublu elicoidale, precum dimerii de pirimidină produși de radiațiile UV sau modificările chimice determinate de benzpiren, aflatoxină și cisplatin. Acest sistem de reparare este complex și implică un număr mare de proteine și gene.

> Aceste gene au fost identificate la pacienți cu diferite mutații ce produc trei afecțiuni rare: *xeroderma pigmentosum* (XP), *sindromul Cockayne* (CS) și o formă cu fotosensibilitate a *trichotiodistrofiei* (TTD). Trăsătura comună este sensibilitatea foarte accentuată la expunerea solară, ca urmare a reparării deficitare a leziunilor ADN induse de radiațiile UV; în schimb, celelalte manifestări clinice sunt extrem de diferite. Pacienții cu *XP* prezintă o creștere foarte accentuată, de peste 2.000 de ori, a riscului pentru apariția unui cancer cutanat și, în multe cazuri, o neurodegenerare accelerată. Pacienții cu *CS* prezintă anomalii neurologice degenerative progresive foarte severe și manifestări de îmbătrânire precoce. *TTD* este caracterizată prin aspectul fragil al părului și unghiilor, precum și unele trăsături prezente și în CS.

Mecanismul prin care este *recunoscută leziunea ADN* este o problemă încă mult discutată. În prima etapă intervine un complex specific (XPC-hHR23B) ce recunoaște distorsiunea ADN produsă de agenții mutageni și *localizează* catena lezată. Apoi, la nivelul leziunii se formează un macroagregat proteic necesar pentru *incizia dublă a catenei* ce conține leziunea. După *îndepărtarea* unui fragment de 24-32 de nucleotide care conțin leziunea, au loc *resinteza ADN*, prin intermediul ADN-polimerazei δ sau ε și *legarea capetelor*, prin intermediul ligazei 1 (figura 7.19.b).

c) Repararea rupturilor ADN

Rupturile monocatenare ale ADN sunt produse de speciile reactive de oxigen și reparate prin intermediul enzimelor responsabile de ultimele etape ale mecanismului BER.

Rupturile bicatenare ale ADN, mai rare decât cele monocatenare, pot apărea fie spontan (în cursul replicării, recombinării meiotice sau recombinării somatice VDJ, ce au loc în sinteza imunoglobulinelor), fie ca urmare a expunerii la radiațiile ionizante. Repararea rupturilor bicatenare este un proces complex ce se realizează în mai multe etape. Prima etapă constă în *sesizarea* prezenței unei rupturi ADN bicatenare, prin intervenția probabilă a unui complex multiproteic, numit BASC (*BRCA1 – associated genome surveillance complex*). Următoarea etapă este una de *semnalizare*, care implică activitatea a două kinaze înrudite: ATM și ATR. Acestea produc *activarea* unor proteine importante pentru repararea propriu-zisă (NBS1 sau BRCA1) sau blocarea ciclului celular la nivelul punctului de control G2/M (prin intermediul proteinelor MDM2 și p53). După aceste etape comune, celula alege unul dintre mecanismele alternative de reparare: recombinarea omoloagă sau unirea neomoloagă a capetelor.

- **Recombinarea omoloagă** (*homologous recombination – HR*) este mecanismul cel mai frecvent utilizat la om și este un mecanism de reparare precis, ce utilizează pentru reparare o catenă de ADN intactă de pe cromatida soră sau de pe cromozomul omolog (figura 7.19.c).

  Recombinarea omoloagă debutează prin procesarea inițială a capetelor rupte de complexul NBS1-MRE11--RAD50 (activat de către proteina ATM), ce va conduce la formarea unor capete 3' monocatenare. RAD52 se atașează la capetele monocatenare astfel formate și le protejează. Apoi, ADN-ul intact de la nivelul cromatidei soră sau a cromozomului omolog este utilizat ca matriță pentru a înlocui informația genetică în cursul procesului nucleolitic. În final intervine o etapă de ligare, ce completează acest mecanism de reparare a ADN-ului.

- **Unirea neomoloagă a capetelor** (*non-homologous end-joining – NHEJ*) este un mecanism predispus la erori (mici inserții sau deleții) în care capetele rupte ale ADN-ului sunt unite fără nici o omologie ori cu ajutorul unor secvențe omoloage scurte (< 10 pb) (figura 7.19.d).

  Unirea neomoloagă a capetelor rupte debutează prin legarea heterodimerului KU70/KU80 la nivelul capetelor ADN care activează apoi o protein-kinază ADN-dependentă. Intervine, de asemenea, complexul NBS1-MRE11-RAD50, care are atât activitate enzimatică, cât și structurală. Una dintre activitățile importante ale proteinei NBS pe această cale este activarea recombinazelor RAG1 și RAG2 (care intervin în procesul de recombinare VDJ din cursul sintezei imunoglobulinelor). Complexul XRCC4/ligază 4 este

BCU CLUJ / UNIVERSITY LIBRARY

necesar pentru unirea capetelor rupte. Repararea poate fi în acest caz fie precisă, fie asociată cu pierderea sau adiția unor nucleotide, ceea ce conduce la o mutație.

Mutațiile genelor ce codifică proteine care intervin în repararea rupturilor ADN-ului pot determina numeroase boli: *ataxia telangiectazia, sindromul Nijmegen, sindromul Bloom, anemia Fanconi, cancerul de sân ereditar*. Majoritatea lor implică mutații ale proteinelor ce intervin în calea HR și au transmitere recesivă, deși există și exemple de boli cu transmitere dominantă.

- **Ataxia telangiectazia** (AT) este o afecțiune rară (circa 1 la 100.000 de locuitori), care se manifestă clinic prin ataxie (datorită unei degenerări neuronale progresive), prezența telangiectaziilor, vizibile în special la nivelul conjunctivei bulbare, radiosensibilitate, imunodeficiență și un risc crescut pentru apariția cancerelor, mai ales a limfoamelor. Heterozigoții (circa 1% din populație) au un risc crescut pentru cancerul de sân. Boala este determinată de mutația genei ATM (cromozomul 11q22) ce codifică o protein-kinază care activează numeroase proteine implicate în căile de reparare ale rupturilor ADN sau în punctul de control G2/M al ciclului celular.
- **Cancerul de sân ereditar** este una dintre cele mai frecvente boli genetice (circa 1 la 800 de indivizi) caracterizată printr-un risc crescut de apariție a unui neoplasm mamar (36-85%), precum și pentru cancerul de ovar (16-60%). Debutul bolii este adeseori precoce și uneori bilateral. Au fost identificate două gene: *BRCA1* (17q21) și *BRCA2* (13q12), ce codifică proteine care interacționează cu RAD51 în calea de reparare HR a rupturilor ADN bicatenare.

4.2. *Repararea leziunilor la nivelul ADN mitocondrial*

Absența histonelor cu rol protector și mediul foarte bogat în specii reactive de oxigen, rezultate în cursul sintezei ATP, fac ca ADN mitocondrial să fie mult mai susceptibil la anumite tipuri de leziuni comparativ cu ADN nuclear. În prezent, se cunoaște că la nivelul acestor organite funcționează unele mecanisme de reparare prezente și la nivel nuclear, în timp ce altele sunt absente. Astfel, mitocondriile prezintă capacitatea de reparare a O^6 metilguaninei prin intermediul enzimei MGMT. De asemenea, au fost identificate numeroase componente ce intervin în mecanismul BER, precum unele ADN-glicozilaze, endonucleaza APE1 etc. În schimb, mecanismul NER este absent. Rata mutațiilor care persistă în urma intervenției acestor mecanisme de reparare este considerată a fi de 10 ori mai mare decât în cazul genomului nuclear, și aceasta contribuie la procesul de îmbătrânire și la apariția unor boli degenerative.

4.3. *Tolerarea leziunilor ADN*

În *punctele de control* ale ciclului celular sunt declanșate mecanismele ce blochează progresia celulelor cu leziuni ale ADN pentru a permite repararea lor înaintea replicării. Dar această viziune este o supra-simplificare deoarece în prezent devine tot mai clar faptul că, în anumite condiții (de exemplu, „saturarea" mecanismelor de replicare datorită leziunilor prea numeroase), celulele pot *tolera* unele dintre leziunile ADN, fără a le corecta. Când ajung în dreptul leziunii catenei matriță, ADN-polimerazele sunt confruntate cu următoarea alternativă:

- *înserează la întâmplare* un nucleotid și depășesc astfel „punctul critic", replicând restul ADN din replicon; celula supraviețuiește, dar leziunea ADN persistă, efectul ei depinzând de localizarea leziunii în genom;
- *lasă o breșă* în catena nou-sintetizată și reiau replicarea în aval de locul leziunii; uneori, lacuna produsă poate fi reparată ulterior (prin intervenția unui sistem enzimatic de recombinare postreplicativă).

Prin ambele variante leziunea poate fi corectată sau se produce o reparare infidelă, cu defect.

C. Anomaliile cromozomiale

Anomaliile cromozomiale pot fi definite ca fiind modificări produse de o alterare *vizibilă* a cromozomilor. Evidențierea acestor modificări depinde de tehnica de studiu folosită. Dacă rezoluția maximă a tehnicilor convenționale de citogenetică este de circa 5-10 megabaze, tehnicile de citogenetică moleculară permit observarea unor leziuni cu mult mai mici, ceea ce face dificilă delimitarea clară între anomaliile cromozomiale și mutațiile genice masive (macroleziuni). În aceste condiții, anomaliile cromozomiale se definesc ca *modificări genetice produse prin mecanisme cromozomiale specifice*: segregarea anormală a cromozomilor în meioză sau mitoză, recombinare inter-cromozomială aberantă sau reparare greșită a rupturilor cromozomiale.

Cele mai multe dintre anomaliile cromozomiale produc un *dezechilibru genetic* ce determină *anomalii fenotipice* diverse (întârziere în creștere și dezvoltare, anomalii congenitale multiple, retard mental, tulburări de sexualizare și reproducere, unele forme de

BIBLIOTECA CENTRALĂ UMF IAȘI

cancer ş.a.) şi cu gravitate diferită. Dacă la aceste consecinţe clinice variate şi semnificative, prezente în numeroase specialităţi medicale, adăugăm şi frecvenţa mare a anomaliilor cromozomiale (≥ 8% dintre sarcinile recunoscute clinic, 0,7-1% din nou-născuţii vii), atunci obţinem argumente solide pentru a aprecia că *patologia cromozomială este o problemă majoră de sănătate publică.*

1. Tipurile şi mecanismele de producere a anomaliilor cromozomiale

1.1. Clasificarea anomaliilor cromozomiale

Anomaliile cromozomiale pot fi clasificate în raport cu mai multe criterii (tabelul 7.5).

După *momentul producerii lor*, anomaliile cromozomiale se împart în: **anomalii constituţionale** şi **anomalii dobândite**. Anomaliile constituţionale sunt prezente la naştere şi au originea în cursul gametogenezei unuia dintre părinţi sau în primele etape ale embriogenezei. Anomaliile dobândite apar ulterior în cursul vieţii, sub forma unor *clone* celulare anormale.

Tabelul 7.5. Clasificarea anomaliilor cromozomiale

Criteriu	Tip de anomalie
Momentul apariţiei	• constituţionale • dobândite
Modul de afectare a materialului genetic	• numerice – poliploidii – aneuploidii • structurale – echilibrate – neechilibrate • disomii uniparentale
Numărul de celule afectate	• omogene • în mozaic
Tipul de cromozom afectat	• autozomale • gonozomale
Tipul de celule afectate	• somatice • germinale

În raport cu *modul de afectare a materialului cromozomial*, anomaliile pot fi împărţite în: numerice, structurale şi funcţionale.

- **Anomaliile cromozomiale numerice** sunt modificări ale numărului de cromozomi în raport cu numărul normal, diploid, 2n = 46 de cromozomi. Anomaliile numerice se clasifică în: poliploidii şi aneuploidii. *Poliploidiile* reprezintă prezenţa în plus a unuia sau mai multor seturi haploide complete de cromozomi. *Aneuploidiile* se caracterizează prin prezenţa în plus sau absenţa unuia sau mai multor cromozomi.
- **Anomaliile cromozomiale structurale** se caracterizează prin modificarea structurii normale a cromozomilor. Ele se împart, în raport cu efectul fenotipic, în: *anomalii cromozomiale echilibrate* şi *anomalii cromozomiale neechilibrate.* Anomaliile cromozomiale echilibrate (translocaţii, inversii şi inserţii) sunt caracterizate printr-o modificare a poziţiei unuia sau mai multor segmente cromozomiale, fără afectarea cantităţii totale de material genetic şi, implicit, fără afectarea fenotipului (în marea majoritate a cazurilor). Anomaliile cromozomiale structurale neechilibrate (deleţii, duplicaţii, cromozomi inelari, cromozomi dicentrici şi izocromozomi) sunt caracterizate prin prezenţa suplimentară (trisomie parţială) sau absenţa (monosomie parţială) unor părţi din cromozom ori asocierea dintre câştigul şi pierderea unuia sau mai multor segmente cromozomiale.
- **Anomaliile cromozomiale funcţionale** sunt reprezentate de *disomia uniparentală*, caracterizată prin prezenţa la acelaşi individ a unei perechi de cromozomi ce provin de la acelaşi genitor.

În raport cu *numărul de celule afectate*, anomaliile cromozomiale pot fi împărţite în: **omogene** şi **în mozaic**. Anomaliile omogene se caracterizează prin prezenţa anomaliei în toate celulele individului afectat. Anomaliile în mozaic sunt caracterizate prin prezenţa a două sau mai multe linii celulare ce derivă din acelaşi zigot şi diferă prin numărul sau structura cromozomilor.

În funcţie de numărul de cromozomi implicaţi în producerea anomaliilor acestea se clasifică în **anomalii cromozomiale simple** (sunt interesaţi unul sau doi cromozomi) şi **anomalii cromozomiale complexe** (când sunt implicaţi trei sau mai mulţi cromozomi).

În funcţie de *tipul de cromozom afectat*, anomaliile cromozomiale se clasifică în: **anomalii autozomale** (sunt interesaţi unul sau mai mulţi autozomi), **anomalii gonozomale** (anomalia implică cromozomii X sau Y) şi **anomalii mixte** (când sunt implicaţi cel puţin un autozom şi un gonozom).

În raport cu *tipul celulei afectate*, anomaliile cromozomiale se clasifică în: **anomalii somatice** (modifică fenotipul individului afectat) şi **anomalii germinale** (anomalia nu modifică fenotipul pacientului, dar se poate transmite prin gameţi la descendenţi).

Pentru nomenclatura tuturor acestor tipuri de anomalii cromozomiale se foloseşte un sistem standardizat, elaborat şi reactualizat periodic (ultima actualizare

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fiind ISCN[10] 2009; vezi tabelul 2.4 şi capitolul 2.C.3.3).

1.2. Anomaliile cromozomiale numerice

Numărul de cromozomi ai speciei umane este de 46. Celulele somatice normale sunt *diploide* (*2n* = 46 cromozomi), în timp ce celulele sexuale mature normale – ovulul şi spermatozoidul – sunt *haploide* (*n* = 23 cromozomi). Anomaliile numărului de cromozomi se împart în două categorii: poliploidii şi aneuploidii care, la rândul lor, pot fi omogene sau în mozaic[11].

Este util de precizat că orice multiplu *exact* al lui ***n*** este numit *euploidie*; constituţia cromozomială euploidă (*n*, *2n*, *3n*, *4n*) nu este obligatoriu normală. Termenul *aneuploidie* se referă la orice situaţie în care numărul de cromozomi *nu este euploid*, fie că un cromozom este în plus sau lipseşte.

a) Poliploidiile

Poliploidiile se caracterizează prin prezenţa în plus a unuia sau mai multor seturi haploide (n = 23) de cromozomi. Singurele poliploidii identificate la om sunt: **triploidia** (3n = 69 cromozomi) şi **tetraploidia** (4n = 92 cromozomi). Cauza cea mai frecventă a triploidiei este *dispermia* (fecundarea unui ovul de către doi spermatozoizi). Mai rar, triploidia poate rezulta prin fertilizarea unui gamet normal (n) de către un gamet diploid (2n): spermatozoid (*diandrie*) sau ovul (*diginie*). Tetraploidia se produce de obicei printr-o eroare în prima diviziune a zigotului: ADN a fost replicat, şi cantitatea totală devine 4C, dar nu are loc mitoza şi rezultă o celulă cu o cantitate dublă de material genetic. Datorită acestei modificări, poliploidiile produc modificări majore ale fenotipului, de obicei cu efect letal, produsul de concepţie poliploid fiind eliminat de obicei foarte precoce, în primele săptămâni de sarcină. Triploidiile se întâlnesc la 1-3% dintre sarcinile recunoscute clinic, dar marea majoritate a embrionilor sunt eliminaţi (15-20% dintre avorturile spontane cu anomalii cromozomiale); triploidia (de obicei, sub formă de mozaic 3n/2n) se găseşte numai la 1 din 10.000 de nou-născuţii vii care, evident, nu supravieţuiesc.

Deşi poliploidiile omogene au efecte foarte grave, în unele ţesuturi umane pot fi întâlnite în mod normal celule poliploide. Astfel, în ficat, celulele implicate în regenerarea hepatică sunt tetraploide, în timp ce în măduva osoasă hematogenă există megacariocite octaploide sau chiar cu hexadecaploide.

b) Aneuploidiile

Aneuploidia reprezintă o anomalie cromozomială produsă fie prin pierderea unui cromozom (*monosomie*), fie prin prezenţa în exces a unui cromozom (*trisomie*), mai rar a doi cromozomi (*tetrasomie*) aparţinând aceleiaşi perechi de cromozomi; ele pot interesa autozomii sau cromozomii sexuali.

- *Monosomiile* sunt anomalii caracterizate prin prezenţa într-o celulă somatică a unui singur cromozom, în locul unei perechi de cromozomi (2n-1). Monosomiile autozomale au fost descrise numai la embrioni şi, fără excepţie, monosomiile autozomale complete sunt letale. Singura monosomie compatibilă cu viaţa la om este monosomia X.
- *Trisomiile* se caracterizează prin prezenţa într-o celulă somatică a trei exemplare ale aceluiaşi cromozom, în locul perechii normale de cromozomi omologi (2n+1). La specia umană, majoritatea trisomiilor complete sunt letale, ducând la avorturi spontane precoce. Singurele excepţii sunt unele trisomii autozomale (trisomiile 21, 18, 13 – omogene sau în mozaic şi trisomia 8 în mozaic) şi cele gonozomale (XXX, XXY şi XYY).
- În cazul anomaliilor gonozomilor, sunt posibile şi *tetrasomii* (48,XXXX, 48,XXYY, 48,XXXY) sau chiar *pentasomii* (49,XXXXX, 49,XXXXY). Pentru autozomi au fost descrise doar tetrasomii parţiale: 9p, 12p, 18p, 21q.

Aneuploidiile omogene sunt consecinţa unor erori produse în cursul meiozei: nedisjuncţia cromozomială în meioza I, nedisjuncţia cromatidiană în meioza II şi întârzierea (pierderea) anafazică.

Nedisjuncţia în meioză produce gameţi anormali – cu 24 de cromozomi (disomici) sau cu 22 de cromozomi (nulisomici) – care, după fecundarea cu un gamet normal, formează zigoţi trisomici sau monosomici (vezi figura 6.18). Despre nedisjuncţie vom discuta pe larg în secţiunea 7.C.3; vom preciza aici numai că nedisjuncţia meiotică este frecventă (circa 8% dintre toate sarcinile recunoscute clinic) şi se produce mai ales în ovogeneză, în special în meioza I. Totuşi, nedisjuncţia meiotică paternă este frecventă (70%) în monosomia X şi în trisomia XYY (100%).

Întârzierea anafazică este un accident ce se poate produce în anafazele ambelor meioze (mai frecvent în anafaza II) şi constă în blocarea migrării sau reducerea vitezei de migrare a unui cromozom (cromatidă), urmată de excluderea lui (ei) din nucleu în momentul reformării membranei nucleare. Acest accident de segregare determină formarea de gameţi nulisomici care, prin fertilizare cu gameţi normali, vor produce zigoţi cu monosomie.

10. ISCN *(International System for Human Cytogenetic Nomenclature)* – Sistemul Internaţional de Nomenclatură a Cromozomilor.
11. Unii autori împart anomaliile de număr în poliploidii, aneuploidii şi mixoploidii (mozaicuri şi himere).

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

Aneuploidiile în mozaic sunt de obicei consecinţa unor erori ale mitozei: nedisjuncţia cromatidiană (care va determina mozaicuri cromozomiale de tipul 47/45 sau 47/46/45) şi întârzierea anafazică (produce mozaicuri 46/45, dar numai la cromozomii sexuali – 46,XX/45,X sau 46,XY/45,X – deoarece implicarea unui alt cromozom duce la apariţia de celule monosomice neviabile). Un alt posibil mecanism pentru formarea mozaicurilor cromozomiale numerice îl reprezintă *„corecţia sau salvarea"* unei trisomii omogene la zigot prin întârzierea anafazică, în una din celulele fiice, a unuia din cromozomii implicaţi în aneuploidie. Prezenţa unui cromozom suplimentar poate perturba segregarea mitotică şi duce la pierderea acestuia în unele celule, rezultând apariţia unui mozaic de tipul 2n+1/2n (47/46) [12].

De multe ori, în aceste cazuri, **mozaicul este limitat la nivelul placentei** (*confined placental mosaicism*), embrionul fiind normal. Un astfel de mozaic, dacă este consecinţa unui mecanism de salvare a unei trisomii iniţiale, poate conduce la apariţia unei disomii uniparentale (vezi mai jos, secţiunea 1.4). Într-o astfel de situaţie, este foarte dificilă alegerea unei opţiuni referitoare la finalizarea sarcinii, deoarece, pe de o parte, prezenţa unei placente anormale determină tulburări ale creşterii embrionare şi fetale, iar, pe de altă parte, există riscul ca viitorul copil să prezinte o formă de disomie uniparentală cu manifestare clinică în cazul implicării anumitor cromozomi.

1.3. Anomaliile cromozomiale structurale

Anomaliile cromozomiale de structură (numite şi „mutaţii cromozomiale") se produc, în mod clasic, prin ruperea cromozomilor şi reunirea anormală a capetelor cromozomilor rupţi.

În condiţii experimentale – prin tratarea celulelor umane în cultură cu agenţi „clastogeni" (radiaţii ionizante sau unele substanţe chimice) – s-a stabilit că ruperea unui cromozom produce două *capete instabile*, deoarece nu au telomere. Mecanismele de reparare asigură, de obicei, reunirea corectă a capetelor rupte şi refacerea integrităţii cromozomiale (*restitutio ad integrum*). Totuşi, când se produc mai multe rupturi – în unul, doi sau mai mulţi cromozomi – se poate produce o *reunire incorectă* a capetelor rupte şi rezultă **cromozomi „derivaţi"**, cu o structură anormală. Ei pot fi stabili în condiţiile în care au un centromer şi telomere, structuri ce le asigură segregarea/transmiterea în cursul diviziunii celulare. În schimb, cromozomii derivaţi *acentrici*, *dicentrici* sau *fără telomere* se caracterizează printr-o instabilitate crescută şi vor suferi rearanjări ulterioare sau se vor pierde în timpul diviziunii.

Cele mai multe anomalii structurale spontane din celulele germinale sau somatice se produc însă, foarte probabil, prin *erori de recombinare*.

Recombinarea meiotică este precedată de sinapsa cromozomilor omologi, ce implică împerecherea unor secvenţe identice sau foarte asemănătoare de ADN repetitiv din structura lor; împerecherea *incorectă* generează, prin crossing-over *inegal*, deleţia sau duplicaţia unor segmente cromozomiale. De asemenea, se poate produce o sinapsă între regiuni identice din cromozomi neomologi, ce poate să determine o recombinare accidentală şi producerea unui transfer de segmente între aceşti cromozomi (o translocaţie). Recombinarea omoloagă nealelică sau ectopică se poate produce şi în celulele somatice, între cromatidele unui cromozom sau între cromozomi omologi (vezi secţiunea 7.B.1.3).

În funcţie de numărul de cromozomi implicaţi şi de numărul de rupturi, se produc (prin reparare greşită sau recombinare între cromozomi neomologi) mai multe tipuri de anomalii structurale stabile, sistematizate în tabelul 7.6; la acestea se adaugă un tip special reprezentat de izocromozomi.

În funcţie de consecinţele fenotipice pe care le produc, anomaliile de structură ale cromozomilor se împart în:

- *anomalii echilibrate*, când nu se produce pierdere sau câştig de material cromozomial (translocaţii reciproce echilibrate, inversii), iar fenotipul este, de regulă, normal;
- *anomalii neechilibrate*, atunci când există o pierdere sau un câştig de material cromozomial (deleţii, cromozomi inelari, duplicaţii) ce produce un fenotip anormal.

a) Anomaliile structurale ce implică un singur cromozom

(1) *Deleţiile*

Deleţiile (notate cu ***del*** în nomenclatura ISCN) sunt anomalii cromozomiale structurale neechilibrate, caracterizate prin pierderea unui fragment cromozomial.

În funcţie de localizarea segmentului pierdut, deleţiile pot fi *terminale* şi *interstiţiale*.

- Clasic, **deleţiile terminale** rezultă prin ruperea unui cromozom într-un punct, urmată de pierderea fragmentului terminal acentric şi formarea unui nou telomer la capătul rupt. **Deleţiile interstiţiale** sunt produse prin ruperea unui cromozom în două puncte, situate pe acelaşi braţ, urmată de pierderea

12. Efectul fenotipic al unui astfel de mozaic poate fi mai grav în condiţiile în care prin pierderea cromozomului suplimentar rezultă o disomie uniparentală, iar cromozomul respectiv are loci amprentaţi genetic (vezi capitolul 5.C şi 5.D).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 7.6. Anomalii structurale stabile produse prin repararea greşită a rupturilor cromozomiale sau erori de recombinare

	Un cromozom implicat	Doi cromozomi implicaţi
O ruptură	Deleţie terminală	–
Două rupturi	Deleţie interstiţială	Translocaţie reciprocă
	Cromozom inelar	Translocaţie Robertsoniană
	Duplicaţie sau deleţie prin schimb inegal între cromatidele surori	Duplicaţie sau deleţie prin recombinare inegală
	Inversie	
Trei rupturi	Rearanjări cromozomiale variate (de exemplu, inversie cu deleţie; inserţie intracromozomică)	Inserţie intra-cromozomială (directă sau inversată)

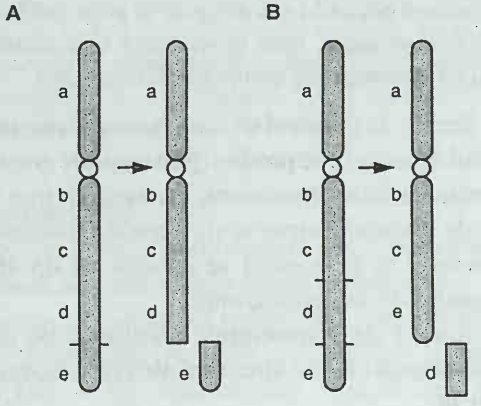


Figura 7.20. Tipuri de deleţii. A: deleţie terminală; B deleţie interstiţială

fragmentului interstiţial şi reunirea fragmentelor restante (figura 7.20).

- În prezent, se consideră că marea majoritate a deleţiilor sunt interstiţiale, iar mecanismul cel mai frecvent de producere îl reprezintă *recombinarea omoloagă nealelică* intra-cromozomială sau inter-cromozomială, mediată de o împerechere greşită a cromozomilor, datorită unor secvenţe repetitive identice sau foarte asemănătoare, dar nealelice. Deleţiile se mai pot produce prin segregarea meiotică a cromozomilor cu translocaţii echilibrate, inserţii sau inversii (vezi secţiunile următoare).

Din punctul de vedere al dimensiunilor, deleţiile se împart în *deleţii microscopice* (≥ 5Mb) – vizibile prin marcaj cromozomial, de preferinţă de înaltă rezoluţie – şi *deleţii submicroscopice*, evidenţiate prin folosirea tehnicilor de citogenetică moleculară (FISH), cu sonde pentru regiunea din cariotipul individului presupusă a fi absentă.

În practică, cele mai frecvente deleţii sunt descrise în braţele scurte ale cromozomilor 4 (sindromul Wolf-Hirschhorn), 5 (sindromul *cri du chat*), 11 şi 18, precum şi în braţele lungi ale cromozomilor 7, 11, 13, 15, 18, 21 şi 22. De asemenea, pot fi implicaţi în deleţii şi cromozomii X şi Y. Deleţiile autozomale microscopice au o incidenţă de 1 la 7.000 de nou-născuţi vii. Cea mai frecventă deleţie, de obicei submicroscopică, este microdeleţia regiunii 22q11.2 asociată *cu* sindromul DiGeorge – Velo-cardio-facial, cu o incidenţă de 1:2.000.

Toate deleţiile produc **o monosomie parţială** pentru regiunea cromozomială implicată. Viabilitatea produsului de concepţie cu deleţie depinde de dimensiunea fragmentului absent, conţinutul genic, de importanţa funcţională a genelor localizate în regiunea deletată şi de capacitatea unei singure alele de a asigura funcţia genei.

În general, se consideră că o monosomie parţială ce depăşeşte 2% din lungimea unui set haploid de cromozomi este incompatibilă cu supravieţuirea. Deleţiile submicroscopice sau microdeleţiile produc **sindroame ale genelor contigue**, în care manifestările fenotipice sunt determinate de pierderea mai multor gene învecinate, gene pentru care prezenţa unei singure alele este insuficientă pentru realizarea funcţiei (fenomenul de haploinsuficienţă). Principalele sindroame cromozomiale cu deleţii sau microdeleţii sunt prezentate în capitolul 11.

(2) *Cromozomii inelari*

Cromozomii inelari (*r* în nomenclatura ISCN) sunt cromozomi anormali caracterizaţi printr-o conformaţie circulară. Mecanismul de producere a acestei anomalii constă în ruperea unui cromozom în două puncte localizate pe braţe diferite, urmată de pierderea fragmentelor acentrice (terminale) şi unirea capetelor fragmentului centric (figura 7.21). Practic, se realizează o deleţie/monosomie parţială a unor segmente terminale din braţele cromozomului.

În funcţie de mărimea regiunii deletate cromozomii inelari se împart în *cromozomi aparent echilibraţi* (cromozomi inelari cu pierdere redusă de material cromozomial, derivaţi cel mai frecvent din cromozomii

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2, 6, 7, 14, 18, 20 şi 22) şi în *cromozomi inelari mici* supranumerari (47,+r) conţinând un centromer şi regiuni pericentromerice cu eucromatină de mărime variabilă. Recombinările mitotice între cromatidele cromozomilor inelari determină formarea de cromozomi inelari dubli sau cu cromatide „împletite", foarte instabili în mitoză, responsabili de apariţia cromozomilor inelari de mărime variabilă în diferite clone celulare.

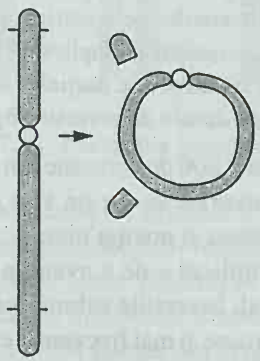


Figura 7.21. Formarea unui cromozom inelar

(3) *Duplicaţiile*

Duplicaţiile (notate cu ***dup*** în nomenclatura ISCN) sunt anomalii cromozomiale structurale neechilibrate, caracterizate prin prezenţa pe unul dintre cromozomi a unui segment în dublu exemplar. Consecinţa genotipică o reprezintă apariţia unei trisomii parţiale pentru segmentul cromozomial duplicat.

Majoritatea duplicaţiilor sunt rezultatul unui *crossing-over inegal* între cromozomii omologi în cursul pahitenului, favorizat de prezenţa unor secvenţe de ADN repetitiv sau de similitudinea între secvenţele unor gene (figura 7.22). Alte surse de trisomii parţiale sunt recombinarea intra-cromozomială la nivelul unei inversii şi segregarea cromozomilor în meioza I în cazul unor translocaţii echilibrate.

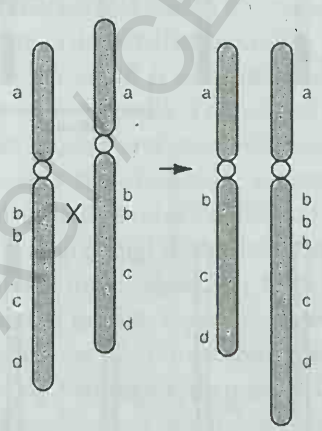


Figura 7.22. Duplicaţie parţială
(produsă prin CO inegal)

Printre cele mai frecvente duplicaţii putem menţiona duplicaţia regiunii 17p12, care determină boala Charcot-Marie-Tooth (vezi capitolul 6.B.1.3).

(4) *Inversiile*

Inversiile (***inv***) rezultă prin ruperea cromozomului în două puncte, urmată de rotirea fragmentului intermediar cu 180° şi reunirea fragmentelor. În funcţie de localizarea punctelor de ruptură, inversiile se clasifică în:

- *paracentrice* – dacă cele două puncte de ruptură sunt situate pe acelaşi braţ, iar fragmentul inversat nu conţine centromerul (figura 7.23.a);
- *pericentrice* – dacă cele două puncte de ruptură sunt situate pe braţe diferite, iar fragmentul inversat conţine centromerul (figura 7.23.b).

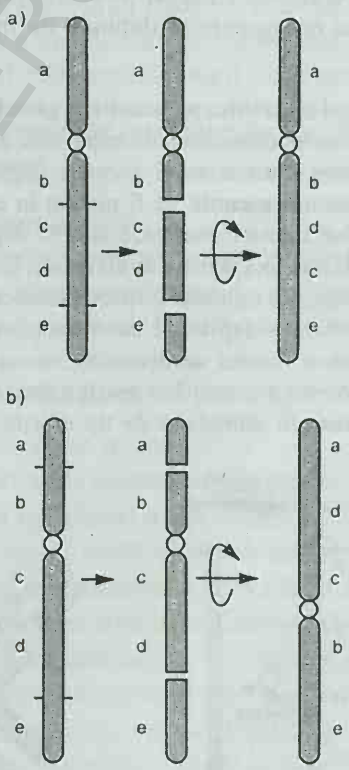


Figura 7.23. a) Inversie paracentrică; b) Inversie pericentrică

Ambele tipuri de inversii pot modifica morfologia cromozomului (distribuţia caracteristică a benzilor), dar inversiile pericentrice produc şi modificarea indicelui centromeric.

Inversiile sunt anomalii cromozomiale echilibrate care nu produc, de regulă, modificări fenotipice[13], deoarece nu determină modificări ale cantităţii de material genetic, ci doar *repoziţionarea* unor gene în cromozom. Excepţiile apar când unul sau ambele

13. Inversiile pericentrice inv(2)(p11.2q13), inv(10)(p11.2q21.2) şi inversiile regiunilor heterocromatice ale braţelor lungi ale cromozomilor 1 şi 9 – inv(1)(p11q12) şi inv(9)(p11q12) – sunt considerate ca polimorfisme cromozomice, fără efect fenotipic.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

puncte de ruptură sunt localizate în interiorul unei (unor) gene, ducând la separarea regiunii codante de regiunea reglatoare, la disrupția secvenței codante sau la formarea unei gene de fuziune.

În schimb, inversiile pot produce *tulburări reproductive* (sterilitate, avorturi spontane, naşterea unor copii plurimalformați) Prezența unei inversii (la fel ca şi a unei translocații reciproce) poate determina perturbarea formării sinapselor între cromozomii omologi ducând la reducerea sau absența *crossing-over*-ului cu blocarea meiozei, responsabilă de sterilitate primară. Datorită faptului că genele nu mai sunt poziționate normal, sinapsa între cromozomii omologi se poate face corect („genă la genă") doar dacă cromatida cu inversie formează o buclă la nivelul inversiei (figura 7.24). Producerea unui *crossing-over* la acest nivel produce gameți neechilibrați; tipul de dezechilibru cromozomial depinde de tipul de inversie.

- În cazul inversiilor paracentrice, gameții anormali pot avea un cromozom dicentric sau, eventual, un fragment cromozomial acentric (figura 7.24.a). Fragmentul acentric va fi pierdut în cursul diviziunilor mitotice ulterioare datorită imposibilității sale de a se fixa la fusul de diviziune. Cromozomul dicentric, sub influența forțelor mecanice exercitate ca urmare a deplasării centromerelor spre poli diferiți ai fusului de diviziune, se va rupe între centromere determinând apariția unor cromozomi cu anomalii complexe de tip deleție-duplicație. Exemplul cel mai cunoscut este inversia-deleția-duplicația brațului scurt al cromozomului 8, anomalie cromozomială cu o frecvență de 1/10.000–30.000 nou-născuți. Apariția acestei anomalii cromozomiale este favorizată de prezența unui polimorfism de tip inversie paracentrică în regiunea 8p23. Manifestările clinice ale inv-del-dup(8p) includ retardul mental, agenezia corpului calos, dismorfie facială, malformațiile cardiace şi hipotonia.
- În cazul inversiilor pericentrice, gameții anormali pot avea cromozomi cu duplicația (trisomie parțială) şi deleția (monosomie parțială) segmentelor cromozomiale distale de inversie (figura 7.24.b).

Circa una din 1.000 de persoane din populația generală poartă o inversie şi are un risc de 5-10% – în funcție de mărimea şi poziția inversiei, precum şi de cromozomul implicat – de a avea un descendent cu cariotip anormal. Inversiile submicroscopice sunt cu mult mai numeroase şi mai frecvente, ele reprezentând polimorfisme cromozomiale. Spre exemplu, inversia regiunii 8p23 este prezentă la persoane normale fenotipic în proporție de 25-40%, în funcție de populația studiată.

(5) *Izocromozomii*

Izocromozomii (***i*** în nomenclatura ISCN) sunt cromozomi anormali, simetrici, caracterizați prin prezența în dublu exemplar a unuia dintre brațe (trisomie parțială) şi absența (monosomie parțială) celuilalt

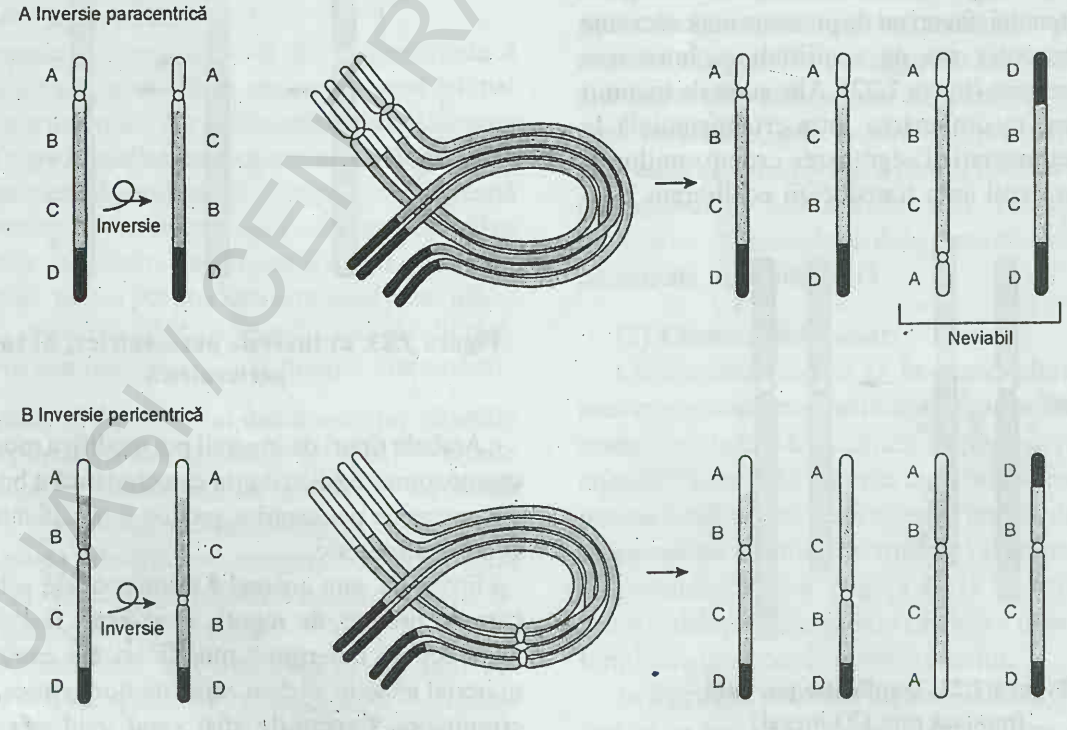


Figura 7.24. Mecanismul de formare a unor cromozomi recombinanți neechilibrați în cazul inversiei paracentrice (a) şi al celei pericentrice (b)

(adaptat după Thompson *et al.*, 1998)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

braț (figura 7.25). Ei pot fi deci izocromozomi de braț scurt sau de braț lung.

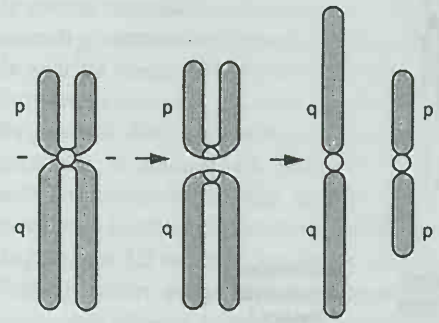


Figura 7.25. Formarea izocromozomilor

Mecanismul clasic de formare a izocromozomilor implică o eroare mitotică – clivarea transversală a centromerului – care determină formarea unui cromozom alcătuit numai din brațe scurte și a altui cromozom constituit numai din brațe lungi. Totuși, acest mecanism a fost rareori dovedit. Un mecanism mult mai probabil este reprezentat de realizarea unui schimb inegal de material cromozomial între cromozomii omologi (cromatidele surori) la extremitatea proximală a brațelor, adiacent centromerului. În acest mod, rezultă de fapt un *cromozom dicentric*, dar prin metodele citogenetice clasice este imposibilă vizualizarea ambelor centromere, localizate foarte aproape unul de celălalt (deseori doar unul este funcțional).

Cel mai frecvent izocromozom este i(Xq), identificat la unele paciente cu sindrom Turner. Mai rar, au fost depistați izocromozomi ai unor autozomi: i(12p), responsabil de sindromul Pallister-Killian, i(18p) și i(21q).

(6) ***Cromozomii marker***

Studiul cariotipului poate evidenția ocazional cromozomi foarte mici numiți cromozomi „marker" (notați cu ***mar*** în nomenclatura ISCN), cromozomi a căror origine nu poate fi stabilită prin tehnicile de citogenetică convențională. Frecvent ei sunt prezenți sub formă de mozaic cromozomial, reprezentând un *extra-cromozom* sau *cromozom supranumerar* față de cariotipul normal sau anormal de bază. Cromozomii marker pot fi cromozomi dicentrici satelizați, derivați cel mai frecvent din cromozomii 15 și 22, sau pot fi mici cromozomi inelari. Deoarece este imposibil de stabilit originea acestor cromozomi prin tehnicile de citogenetică convențională, recurgerea la tehnicile de citogenetică moleculară este indispensabilă în cazul identificării unui cromozom marker supranumerar în analizele prenatale (1:2.500) sau postnatale.

Cromozomii marker derivați din cromozomii 15 și 22 pot fi încadrați în categoria bolilor genomice deoarece mecanismul lor de formare implică recombinare omoloagă nealelică între blocuri de secvențe repetate situate pe brațul lung al acestor cromozomi. În funcție de poziția blocurilor implicate în recombinare, cantitatea de material pericentromeric conținută în cromozomul marker poate fi diferită, variind între simpla duplicare a heterocromatinei pericentromerice (fără efect fenotipic, identificarea unui astfel de cromozom fiind o surpriză în cazul realizării unui cariotip la o persoană fenotipic normală) și trisomia sau tetrasomia unei regiuni de câteva megabaze ce conține eucromatină, cu efect fenotipic major.

Efectul fenotipic este variabil depinzând de cantitatea de eucromatină pericentromerică prezentă. Astfel, cromozomii marker supranumerari derivați din cromozomul 22 și conțin eucromatină sunt responsabili de sindromul „ochiului de pisică" („*cat-eye syndrome*"– OMIM # 115470) caracterizat prin asocierea atreziei anale, a colobomului irian (ce a dat numele acestui sindrom), a anomaliilor preauriculare, a întârzierii mentale și a altor malformații (cardiace, renale).

b) Anomaliile structurale ce implică doi cromozomi

(1) ***Translocațiile***

Translocațiile se caracterizează prin transferul de segmente cromozomiale între doi cromozomi, de obicei neomologi. Au fost identificate trei tipuri de translocații: *translocații reciproce*, *translocații prin fuziune centrică (Robertsoniene)* și *inserții*.

Translocațiile reciproce

Translocațiile reciproce (*t*) se produc prin ruperea (în cursul interfazei) a doi cromozomi neomologi, fiecare în câte un punct, urmată de schimbul reciproc al fragmentelor acentrice și realipirea fragmentelor rupte, cu formarea a doi cromozomi derivați (figura 7.26.a).

Incidența translocațiilor reciproce în populația generală este de aproximativ 1:400 de indivizi. Frecvența acestor anomalii este mai mare la bărbații cu sterilitate primară și la cuplurile cu avorturi spontane recurente. De regulă, translocațiile reciproce sunt specifice unei anumite familii. O translocație relativ frecventă este însă aceea dintre brațele lungi ale cromozomilor 11 și 22.

Purtătorii de translocații reciproce echilibrate au de obicei un *fenotip normal*, deoarece anomalia nu modifică cantitatea totală de material genetic. În schimb, pot apărea *tulburări de reproducere*, determinate de modul particular de sinapsă și de segregare a cromozomilor derivați, cu translocația de segmente în cursul meiozei I. Translocațiile reciproce pot determina blocarea spermatogenezei și *sterilitate* la bărbați, iar femeile purtătoare pot avea o fertilitate redusă. Atunci când gametogeneza este posibilă, se pot forma gameți normali și anormali, în funcție de modul de segregare (figura 7.26.b și c).

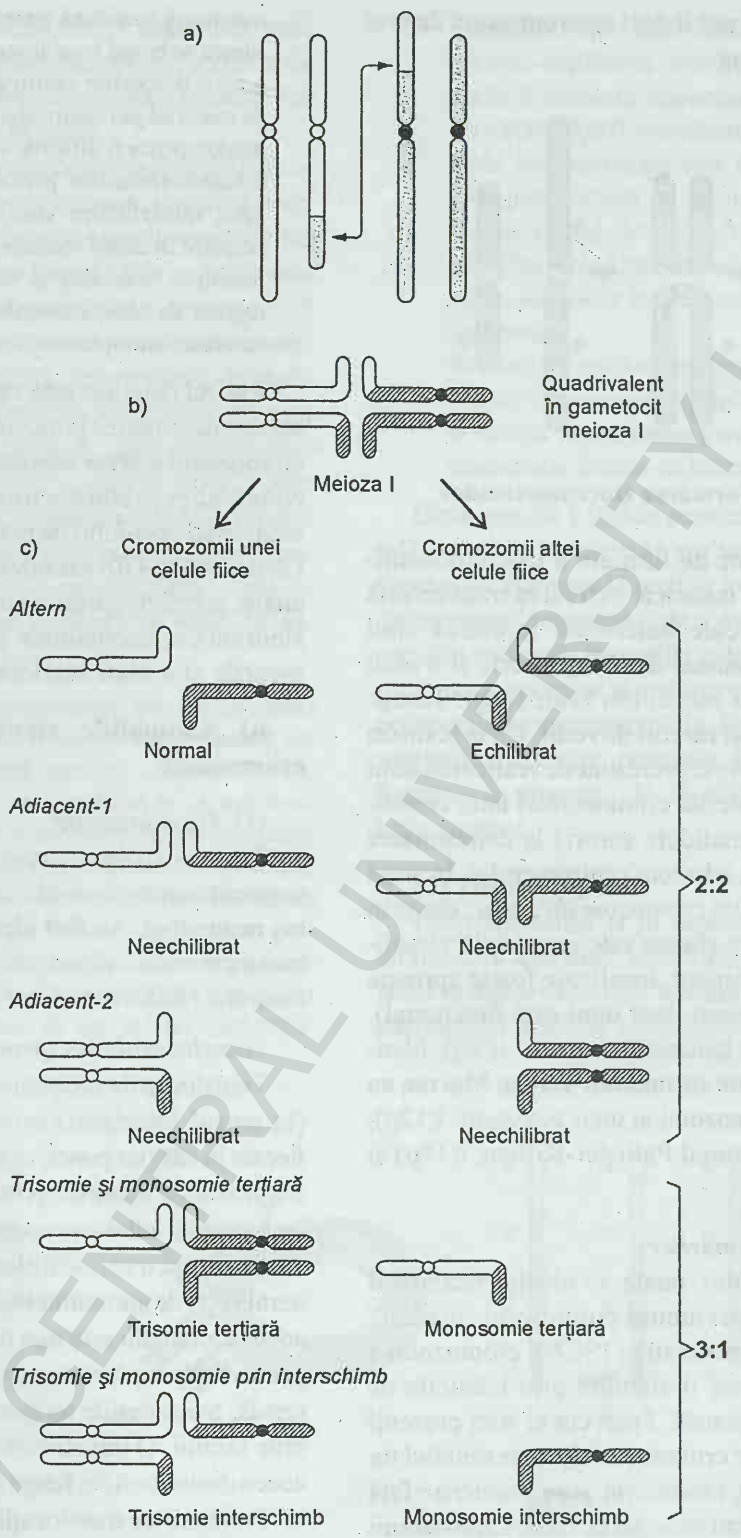


Figura 7.26. Translocaţie reciprocă (a), sinapsa cromozomilor implicaţi în translocaţie în meioza I (b) şi modul lor de segregare în anafaza meiozei I (c)

(centromerii omologi sunt figuraţi în alb – prima pereche – şi, respectiv, în negru, a doua pereche)

În cursul meiozei I, datorită translocaţiei reciproce, cromozomii omologi formează o sinapsă specială, numită *cvadrivalent*, cu aspect de cruce (figura 7.26.b). La nivelul acestei structuri se produce alinierea regiunilor omoloage ale cromozomilor implicaţi în translocaţie. În cursul anafazei I, când se produce *segregarea* cromozomilor omologi, cromozomii cvadrivalentului pot urma trei căi de segregare: 2:2; 3:1; 4:0 – diferite prin numărul cromozomilor ce se distribuie celulelor-fiice.

- Ultimele două căi, complet dezechilibrate, sunt foarte rare şi conduc la gameţi cu anomalii genetice majore, cel mai frecvent incompatibili cu dezvoltarea embrionului sau a fătului. O situaţie particulară o reprezintă translocaţiile în care unul din cromozomii

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

derivați este de talie redusă ca, de exemplu, der(22) rezultat din translocația t(11;22)(q23;q11). În acest caz segregarea 3:1 poate determina formarea de gameți conținând 24 cromozomi – 23 cromozomi normali și cromozomul derivat der(22) – responsabili de apariția trisomiei terțiare (dublă trisomie pentru fragmentul proximal al cromozomului 22 și pentru fragmentul distal al cromozomului 11). Această anomalie cromozomială determină un sindrom polimarformativ compatibil cu dezvoltarea pre și postnatală (sindromul Emanuel, OMIM # 609029).

- Segregarea 2:2 se poate face în trei moduri (figura 7.26.c): *altern*, *adiacent-1* și *adiacent-2*. În cazul *segregării alterne*, cromozomii normali migrează la un pol al fusului de diviziune, la celălalt pol deplasându-se cromozomii derivați. Astfel, rezultă gameți echilibrați genetic, prin a căror fecundare se formează fie zigoți normali, fie zigoți purtători ai translocației echilibrate. În *segregarea adiacent-1*, centromerele neomoloage segregă împreună, în timp ce în *segregarea adiacent-2* se produce o segregare asociată a centromerelor omoloage. În ambele tipuri de segregare rezultă gameți anormali (cu disomie și nulisomie parțială a fragmentelor translocate în cazul segregării adiacente-1 sau cu disomie și nulisomie parțială a fragmentelor centrice, în cazul segregării adiacente-2) care, prin fecundare, vor conduce la zigoți ce asociază trisomia parțială a unuia dintre cromozomi cu monosomia parțială a celuilalt cromozom. Tipul de segregare adiacentă este dependent de mărimea segmentelor cromozomiale schimbate între cromozomii translocați. Dacă segregarea adiacentă-1 este favorizată de fragmente translocate de talie mică, cea adiacentă-2 este favorizată în cazul fragmentelor translocate mari.

O formă particulară de translocație reciprocă o reprezintă *translocațiile criptice subtelomerice*, translocații reciproce implicând segmente de dimensiuni variabile ale regiunilor subtelomerice. Aceste anomalii cromozomiale fiind, cel mai frecvent, sub limita de rezoluție a cariotipului, pot fi identificate doar prin tehnici de citogenetică moleculară (FISH cu sonde corespunzătoare tuturor regiunilor subtelomerice, cu excepția brațelor scurte ale cromozomilor acrocentrici satelizați). Purtătorii acestui tip de translocație au un cariotip considerat normal prin tehnicile standard și sunt fenotipic normali. Translocația se poate însă dezechilibra în meioză, determinând formarea de gameți neechilibrați genetic. Talia regiunilor mosomice/trisomice fiind redusă, embrionii rezultați sunt viabili și manifestările fenotipice vor fi evidente, cel mai frecvent, după naștere, adesea sub forma asocierii unei dismorfii faciale cu întârziere a dezvoltării psihomotorii sau cu retard mental, fără malformații ale organelor interne. Studiile seriilor mari de copii cu întârziere a dezvoltării psihomotorii și cu retard mental apreciază frecvența medie a acestui tip de anomalie cromozomială la aproximativ 5%, cifră variabilă în funcție de criteriile de selecție ale pacienților.

În translocațiile reciproce echilibrate, riscul teoretic de apariție a unor descendenți anormali (cu trisomie sau monosomie parțială) este ridicat – 50% –, dar riscul practic de apariție a unor copii cu anomalii cromozomiale neechilibrate este de 1-10%, dependent de tipul translocației, deoarece majoritatea embrionilor neechilibrați sunt neviabili.

Translocațiile Robertsoniene

Translocațiile Robertsoniene (*rob*) implică doi cromozomi acrocentrici satelizați (exceptând deci cromozomul Y), omologi sau neomologi. Aceștia se rup la nivelul centromerelor sau al brațelor scurte, foarte aproape de centromer, iar brațele lungi fuzionează și formează un cromozom derivat, monocentric sau pseudodicentric, brațele scurte fiind pierdute (figura 7.27). Ca urmare, numărul de cromozomi se reduce la 45. Deoarece brațele scurte ale celor cinci perechi de acrocentrici conțin copii multiple ale genelor pentru ARN ribozomal, pierderea brațelor scurte a doi acrocentrici nu va avea efect fenotipic anormal (căci rămâne un număr suficient de copii al acestor gene pe cromozomii acrocentrici normali).

Incidența globală a translocațiilor Robertsoniene în populație este de aproximativ 1:1.000 de indivizi, ele fiind cele mai frecvente anomalii structurale la om, mai ales translocațiile dintre cromozomii 13 și 14 – rob(13;14)[14] și între cromozomii 14 și 21 – rob(14;21).

Translocațiile Robertsoniene, deși nu afectează fenotipul, pot produce gameți dezechilibrați și descendenți anormali. Riscul de apariție al unor descendenți anormali diferă în funcție de tipul cromozomilor implicați în translocație (omologi sau neomologi) și de sexul părintelui purtător.

- În cazul unei translocații între cromozomi neomologi, de exemplu, între cromozomii 14 și 21, se pot forma 6 tipuri de gameți (figura 7.27.c); prin fecundarea lor cu gameți normali rezultă șase tipuri de zigoți: normal, echilibrat cu translocație Robertsoniană, cu trisomie 14, cu monosomie 14, cu trisomie 21, cu monosomie 21. Zigoții monosomici și cu trisomie 14 dau embrioni neviabili, eliminați prin avorturi spontane. În această situație, riscul teoretic de apariție a unui copil cu trisomie 21 (sindrom Down) este de 33%; riscul real este mai mic (deoarece o parte dintre embrionii cu trisomie 21 sunt eliminați prin avort spontan) și depinde de sexul purtătorului: în cazul femeilor, riscul este de 10%, în timp ce la bărbați, riscul este de 1-3%, deoarece anomalia blochează de obicei spermatogeneza.

14. Translocația rob(13q;14q) afectează aproximativ 1/1.300 de persoane.

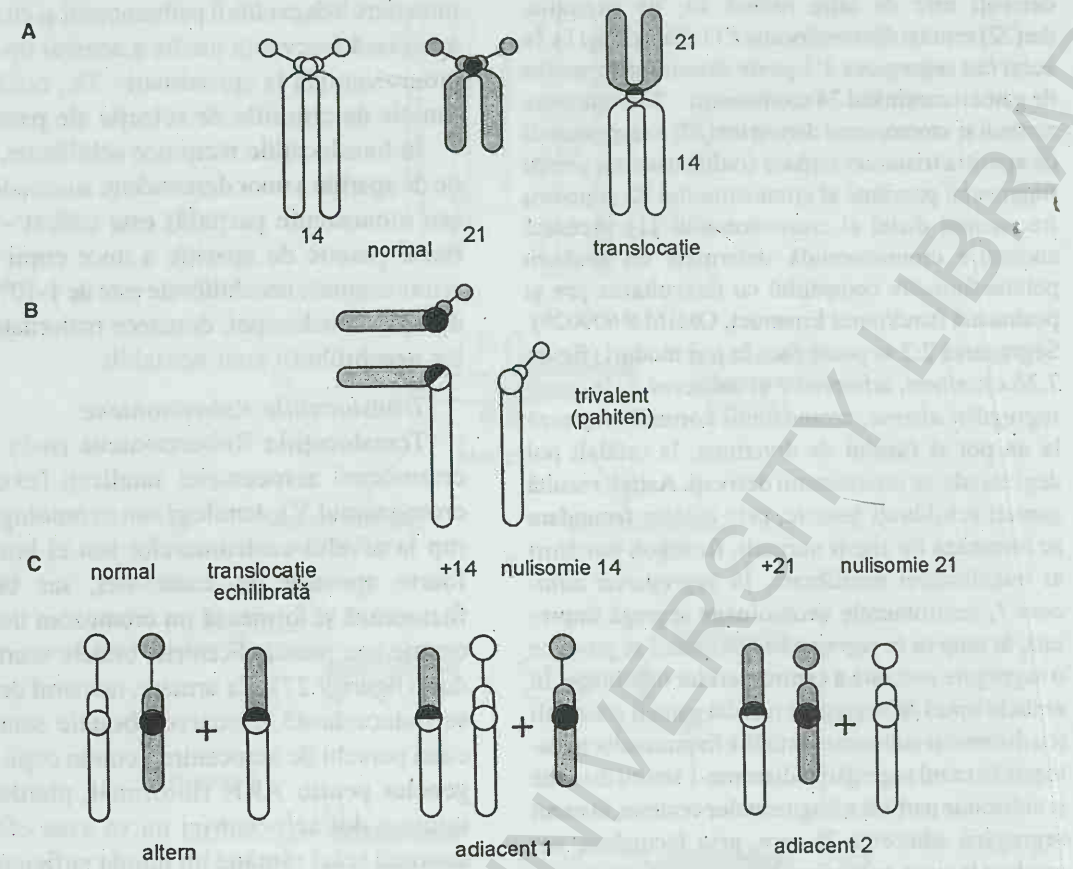


Figura 7.27. Translocație Robertsoniană între cromozomii 14 și 21 (a), sinapsa cromozomilor în meioza I (b) și segregarea lor meiotică (c)
(după Feingold *et al.*, 1998)

- O situație specială se întâlnește în cazul purtătorilor unei translocații Robertsoniene între cromozomi omologi, de exemplu, între doi cromozomi 21. În meioză se formează gameți cu disomie 21 (ce conțin cromozomul derivat) și cu nulisomie 21 care, după fecundare cu un gamet normal, vor forma zigoți cu trisomie 21 sau cu monosomie 21 (neviabili). Acest caz constituie una dintre puținele situații în care riscul de recurență a unei afecțiuni genetice este de 100%.
- O altă situație specială se întâlnește în cazul purtătorilor unei translocații Robertsoniene implicând un cromozom ce conține gene amprentate (cromozomii 14 și 15). Pierderea accidentală a unuia din cromozomii liberi implicați în trisomie („corectarea trisomiei") poate determina apariția unei clone celulare echilibrate cromozomial (45 cromozomi, unul din ei fiind cromozomul translocat), dar cu disomie uniparentală, dacă cromozomul pierdut este cel provenit de la părintele cu cariotip normal. Disomiile uniparentale ale cromozomilor 14 și 15, atât materne, cât și paterne, determină un fenotip anormal. În cazul formării unui embrion monosomic (prin segregarea unei translocații Robertsoniene sau prin întârziere anafazică), nondisjuncția cromatidiană în primele diviziuni mitotice poate determina corectarea monosomiei și duce la formarea unei clone celulare echilibrate cromozomial (46 cromozomi), dar cu disomie uniparentală sau cu posibilitatea apariției unei boli autozomal recesive pentru genele localizate pe acest cromozom sau a unei disomii uniparentale (vezi secțiunea 7.C.1.4.)

(2) **Inserțiile**

Inserțiile (***ins***) sunt translocații nereciproce, care implică transferul unui fragment cromozomial de pe un cromozom pe un cromozom neomolog. Mecanismul de apariție a anomaliei constă în ruperea a doi cromozomi neomologi, dar necesită trei puncte de ruptură: două pe un cromozom și unul pe celălalt cromozom; fragmentul liber al cromozomului cu două rupturi este transferat și inserat (în poziție normală sau inversat) la nivelul punctului de ruptură al celui de-al doilea cromozom (figura 7.28). Datorită acestei particularități, inserțiile sunt anomalii cromozomiale relativ rare.

În cazul inserțiilor, anomalia nu modifică fenotipul purtătorului, dar poate conduce la tulburări de reproducere, datorită malsegregării cromozomilor derivați în cursul meiozei I. Un individ purtător al unei translocații cu inserție poate avea copii normali, copii purtători ai anomaliei echilibrate,

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

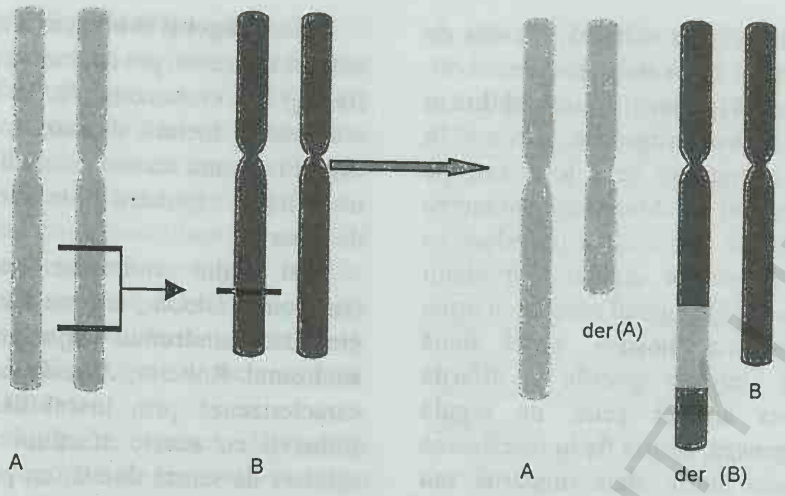


Figura 7.28. Mecanismul de realizare a unei inserții parțiale

copii cu monosomie parțială și copii cu trisomie parțială.

(3) ***Cromozomii dicentrici***

Cromozomii dicentrici (*dic*) se formează printr-o translocație neechilibrată, cu ruperea în câte un punct a doi cromozomi, urmată de unirea fragmentelor centrice într-un cromozom derivativ și pierderea fragmentelor acentrice. Numărul de cromozomi din celulă se reduce de la 46 la 45 (figura 7.29). De obicei, cromozomii dicentrici sunt instabili în cursul mitozei[15] ; menținerea lor pe parcursul mai multor generații celulare se face prin inactivarea unuia dintre centromere (cromozomii fiind, în acest caz, pseudodicentrici). Frecvent, cromozomii derivați din translocațiile Robertsoniene sunt cromozomi pseudodicentrici.

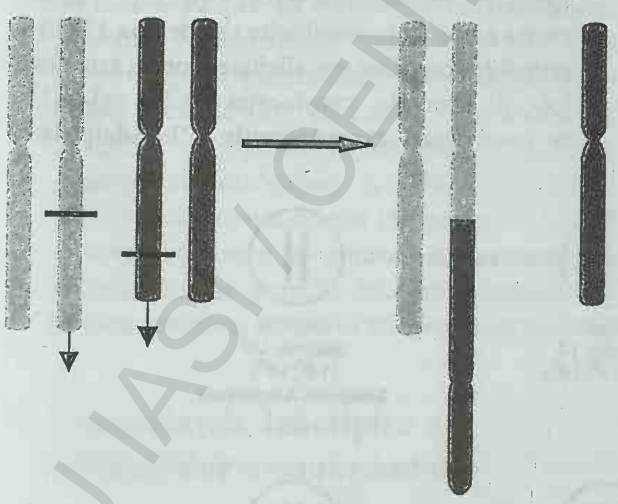


Figura 7.29. Mecanismul de formare a unui cromozom dicentric

1.4. Disomiile uniparentale

Disomiile uniparentale sunt *anomalii cromozomiale funcționale* caracterizate prin prezența unei perechi de cromozomi moșteniți de la același genitor (vezi și capitolul 6.D.3).

Mecanismul de producere a disomiilor uniparentale implică procese de *corectare* („salvare") a unor aneuploidii omogene, existente în primele etape ale embriogenezei. În cazul corectării unei monosomii, aceasta poate fi „salvată" prin duplicarea cromozomului implicat, rezultând obligatoriu o disomie uniparentală. În cazul prezenței unei trisomii, corecția constă în *eliminarea* unuia dintre cei trei cromozomi omologi. În funcție de originea trisomiei (nedisjuncție în meioza I sau în meioza II) (vezi figura 6.18) și de cromozomul pierdut, există trei posibilități:

- zigot disomic normal, fiecare din cei doi cromozomi omologi provenind de la unul din părinți;
- zigot disomic cu cei doi cromozomi omologi provenind de la un singur părinte ca urmare a unei nedisjuncții în meioza II (izodisomie), cromozomii purtând deci alele identice;
- zigot disomic cu cei doi cromozomi omologi provenind de la un singur părinte ca urmare a unei nedisjuncții în meioza I (heterodisomie), cromozomii purtând deci alele diferite;

Disomia uniparentală poate avea efecte patologice atunci când realizează o stare de homozigoție a unei gene recesive sau când cromozomul implicat conține gene amprentate (vezi capitolul 4.D.1.2.b).

Genomurile parentale nu sunt echivalente funcțional. La nivelul anumitor loci se exprimă

15. Prezența ambelor centromere rămase active determină anomalii de atașare la fibrele fusului de diviziune și dificultăți de segregare în cursul diviziunii, ceea ce conduce la ruperea cromozomului dicentric și formarea de cromozomi monocentrici cu anomalii de tip deleție sau deleție-duplicație.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fenotipic fie alela de origine maternă, fie cea de origine paternă (cea de-a doua alelă fiind inactivă). **Amprentarea genomică** (parentală) este stabilită în cursul spermatogenezei sau ovogenezei şi constă în marcarea specifică a anumitor gene localizate pe unii cromozomi. Procesul are două etape: ştergerea amprentării moştenite de la părinţi şi introducerea noii amprentări caracteristice sexului individului respectiv (vezi figura 4.22). Zigotul rezultat în urma fertilizării gameţilor va moşteni astfel două genomuri parentale marcate specific şi diferite funcţional. Marcarea acestor gene, de regulă implicate în embriogeneză, constă fie în inactivarea prin metilare a uneia dintre alele (maternă sau paternă), fie în modificarea regiunii reglatoare a uneia dintre alele.

Un exemplu de corectare a unei trisomii 15 este prezentat în figura 7.30. În cazul trisomiei 15 de origine paternă, prin pierderea cromozomului 15 de origine maternă se va naşte un copil cu *sindrom Angelman*. În cazul trisomiei 15 de origine maternă, prin pierderea cromozomului 15 de origine paternă se va naşte un copil cu *sindrom Prader-Willi*.

Teoretic, pot exista disomii uniparentale pentru toţi cromozomii umani. Dintre cele 23 de disomii uniparentale identificate doar câteva au implicaţii patologice datorită existenţei de regiuni amprentate: 15q paternă (*sindrom Angelman*), 15q maternă (*sindrom Prader-Willi*), 14q paternă şi maternă, 11p paternă (*sindrom Beckwith-Wiedemann*), 6 paternă (*diabetul zaharat tranzitoriu al nou-născutului*) şi 7 maternă (*sindrom Silver-Russell*).

1.5. Anomaliile cromozomiale dobândite

Anomaliile cromozomiale dobândite sunt produse în celulele somatice, după naştere, spontan sau sub acţiunea unor agenţi mutageni, în anumite sindroame de instabilitate cromozomială, ori în cancer.

Diferiţi **agenţi mutageni**, substanţe chimice sau radiaţii ionizante, pot determina rupturi cromatidiene (în G_2) sau cromozomiale (în G_1) cu formarea de cromozomi inelari, dicentrici, deleţii sau translocaţii. Frecvenţa acestor anomalii este dependentă de intensitatea expunerii şi de eficienţa mecanismelor de reparare.

Mai multe sindroame ereditare monogenice (sindromul Bloom, anemia Fanconi, Ataxia-telangiectazia, sindromul Nijmegen, sindromul ICF, sindromul Roberts, *Xeroderma pigmentosum*) se caracterizează prin **instabilitate cromozomială**. Bolnavii cu aceste afecţiuni prezintă, în culturi celulare de scurtă durată, un procentaj anormal de mare de rupturi cromozomiale sau cromatidiene, de schimburi de fragmente şi de figuri triradiale sau cvadriradiale (ce atestă un *crossing-over* somatic) sau alte defecte (instabilitate centromerică, separarea regiunilor de heterocromatină etc.); de subliniat faptul că aceste modificări nu sunt clonale. Natura modificărilor cromozomiale şi defectul molecular (în replicarea sau repararea ADN) care stă la baza lor sunt diferite în fiecare afecţiune. Majoritatea acestor sindroame au un risc crescut de transformare malignă.

Celulele maligne pot prezenta diferite anomalii cromozomiale ce nu există în ţesuturile neimplicate în procesul tumoral. Anomaliile cromozomiale în tumori şi leucemii se pot clasifica în anomalii clonale (care au adesea un caracter neîntâmplător) şi anomalii secundare.

- *Anomaliile clonale* sunt mai frecvente în anumite tipuri de neoplazii, fiind mai mult sau mai puţin specifice; de exemplu, t(15;17)(q22;q12) în leucemia acută cu promielocite sau deleţia 13q14 în retinoblastom. Dar specificitatea lor nu este absolută; de exemplu, translocaţia t(9;22) (q34;q11), ce corespunde **cromozomului Philadelphia**, a

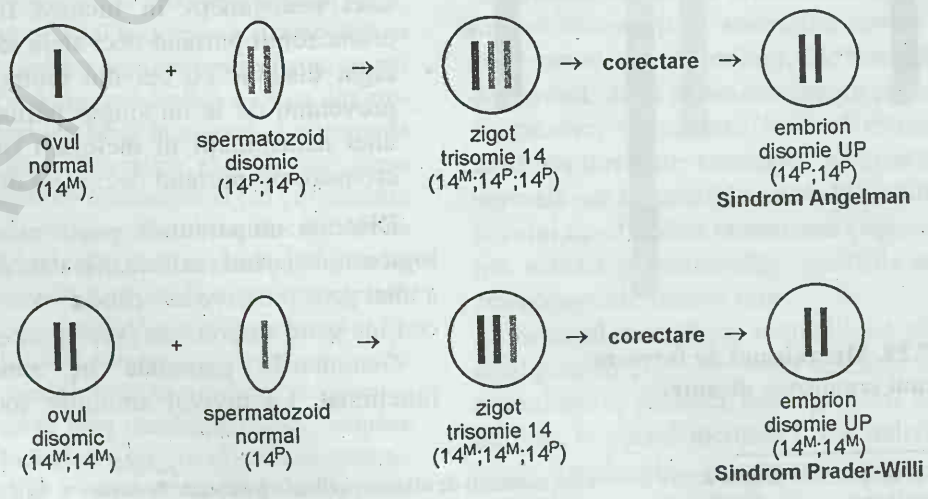


Figura 7.30. Disomie uniparentală prin corectarea unei trisomii 14

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITAR

fost considerată inițial specifică leucemiei mieloide cronice, dar ulterior a fost descrisă și în anumite leucemii acute. Cert este faptul că diferite tipuri de anomalii structurale (amplificări ale unor regiuni cromozomiale, translocații reciproce, inversii, deleții) caracteristice unor neoplazii, produc o serie de modificări moleculare (expresia excesivă a unor oncogene, formarea unor gene hibride, pierderea unor gene supresoare de tumori) implicate în etiopatogenia tumorală (inițierea procesului de transformare malignă, progresia, metastazarea) (vezi capitolul 18).

Un aspect particular din punct de vedere citogenetic îl au *amplificările genomice* ce se pot manifesta citologic fie prin **cromozomi minusculi dubli** („*double minutes*"), ce apar dedublați în metafază, fie prin **segmente cromozomiale colorate omogen** (*HSR – homogeneously staining region*) sau anormal (*ABR – abnormal banded region*). Aceste modificări corespund unor segmente cromozomiale în care numărul de copii al unei regiuni cromozomiale conținând o oncogenă este important.

- *Anomaliile secundare* (de număr și/sau structură) apar în stadiile mai tardive și invazive ale dezvoltării tumorale. Ele sugerează faptul că un element important al progresiei cancerului este alterarea unor gene implicate în menținerea integrității și stabilității cromozomilor și în asigurarea segregării lor mitotice corecte. *Instabilitatea cromozomială* în cancer – definită ca o frecvență crescută și persistentă a pierderii sau câștigului unui cromozom întreg – se corelează pozitiv cu un pronostic grav pentru pacient. Mecanismele care stau la baza instabilității cromozomiale sunt multiple și includ defecte în: coeziunea cromozomilor, numărul de copii al centrozomilor, dinamica atașării microtubulilor la kinetocori și/sau perturbarea ciclului celular (în special în funcția punctelor mitotice de control). Cunoașterea lor aprofundată ar permite blocarea instabilității cromozomiale și limitarea creșterii tumorale.

2. Consecințele fenotipice ale anomaliilor cromozomiale

În funcție de consecințele fenotipice, anomaliile cromozomiale constituționale se pot împărți în două mari categorii:

- anomalii neechilibrate – *în care se produce o pierdere sau un câștig de material cromozomial, și fenotipul este* anormal;
- anomalii echilibrate – *fără modificări cantitative de material genetic și cu fenotip normal.*

În prima categorie se încadrează, firesc, toate anomaliile numerice (poliploidiile, trisomiile, monosomiile) și o parte dintre anomaliile de structură, cele neechilibrate (delețiile, cromozomii inelari, duplicațiile, izocromozomii), în care se produc trisomii (foarte rar tetrasomii) sau monosomii parțiale. În a doua categorie se includ translocațiile reciproce echilibrate, inversiile și inserțiile, care nu modifică cantitatea de material cromozomial. Această clasificare este relativă deoarece:

- în translocațiile Robertsoniene se pierd totuși porțiuni din brațele scurte ale cromozomilor acrocentrici implicați, dar fenotipul rămâne normal, întrucât segmentele pierdute conțin gene pentru ARN ribozomal (care se găsesc în număr suficient pe brațele scurte ale celorlalți cromozomi acrocentrici);
- uneori, translocațiile și inversiile pot produce un fenotip anormal dacă punctele de ruptură alterează secvențele codante, dacă plasează unele gene într-o regiune cu heterocromatină inactivă (efect de poziție) *sau dacă la nivelul punctelor de rupere sunt prezente microdeleții sau microduplicații (studii recente folosind cipuri genomice oligonucleotidice de mare densitate au permis identificarea de microdeleții/microduplicații de mărime variabilă la aproximativ 1/3 din translocațiile reciproce studiate)*;
- disomiile uniparentale nu modifică cantitatea de material genetic, dar pot determina, prin mecanismele precizate mai sus, un fenotip anormal.

2.1. Consecințele anomaliilor cromozomiale neechilibrate

Anomaliile cromozomiale de număr sau de structură neechilibrate sunt modificări *cantitative* ale materialului genetic („*anomalii de dozaj genic*"), întrucât informația genetică din cromozomii supranumerari sau modificați structural este *calitativ normală*. Pentru aceasta pledează faptul că indivizii fertili cu anomalii cromozomiale numerice (de exemplu, femeile cu trisomie 21 sau cu trisomie X) pot avea descendenți normali. Fenotipul anormal este, în principiu, consecința unui *dezechilibru genomic cantitativ*.

Absența unei regiuni cromozomiale sau prezența unei copii suplimentare determină, teoretic, scăderea sau creșterea nivelului de ARNm corespunzător genelor localizate pe acel cromozom și normal exprimate la 50% sau 150%. În realitate situația este diferită căci mecanismele de realizare a homeostaziei celulare sunt complexe. Astfel, studiul expresiei genelor localizate

pe cromozomul 21 în celule derivate de la pacienți cu sindrom Down a demonstrat că pentru unele gene cantitatea de ARNm este crescută, pentru altele este diminuată și pentru altele rămâne neschimbată.

Dezechilibrul genetic, indiferent de tip, determină o serie de „semne comune": tulburări de creștere prenatală și postnatală, dismorfie facială și frecvent anomalii congenitale majore multiple, displazii, dermatoglife anormale, alterări ale structurii și funcției SNC (întârziere în dezvoltarea psiho-motorie, retard mental), tulburări ale funcției gonadale. Cunoașterea lor poate orienta un diagnostic spre categoria *„boli cromozomiale"*.

Gravitatea afectării fenotipice depinde de mai mulți factori.

(1) *Mărimea dezechilibrului genetic.*

Poliploidiile, trisomiile cromozomilor mari și monosomiile autozomale sunt letale, iar gravitatea trisomiilor autozomale viabile este proporțională cu mărimea cromozomului (tri 13 > 18 > 21).

(2) *Tipul de anomalie*

- Monosomiile sunt mai grave decât trisomiile și sunt letale pentru toți autozomii, precum și în cazul majorității monosomiilor X (unii autori consideră că cele mai multe dintre pacientele cu cariotip 45,X prezintă de fapt o monosomie X în mozaic 46,XX/45,X, linia normală lipsind în culturile de limfocite).
- Aneuploidiile cromozomilor sexuali sunt mai puțin grave decât cele autozomale, datorită inactivării parțiale a cromozomilor X suplimentari sau numărului redus de gene al cromozomului Y.

(3) *Conținutul genic și cantitatea de eucromatină/heterocromatină a cromozomului implicat.*

În acest context, se explică de ce trisomia 21 este mai puțin gravă decât trisomia 22 – ambii cromozomi fiind apropiați ca mărime – precum și *semnele specifice și gravitatea diferită* a unor trisomii parțiale pentru segmente identice ca dimensiune. Anomaliile ce interesează benzile R (pozitive), ce conțin multă eucromatină, sunt mai grave decât cele ce interesează benzile G (pozitive), bogate în heterocromatină.

(4) *Numărul celulelor afectate*

Aneuploidiile omogene sunt mai grave decât cele reprezentate de mozaicuri de celule anormale și normale. Reamintim (vezi capitolul 6.B.2) că efectele fenotipice ale mozaicurilor cromozomiale depind de:

- momentul ontogenetic în care se produc (apariția precoce este corelată cu o gravitate mai mare);
- distribuția clonelor în diferite țesuturi (vezi mozaicism limitat la placentă; mozaicurile germinale sau clonele celulare ce produc cancer);
- tipul cromozomului implicat (mozaicurile gonozomale sunt mai puțin grave decât cele autozomale).

2.2. *Consecințele anomaliilor cromozomiale echilibrate*

Așa cum am precizat mai sus, cu câteva excepții, anomaliile cromozomiale echilibrate – translocațiile reciproce, inversiile și inserțiile – determină un *fenotip normal*. Ele pot avea însă consecințe reproductive serioase (vezi și capitolul 11.C):

- *blocarea gametogenezei* datorită sinapsei anormale între cromozomii omologi, determinată de prezența anomaliei structurale;
- *producerea de gameți anormali* (figurile 7.24, 7.26 și 7.27) care, după fecundare, determină formarea de embrioni cu monosomii și/sau trisomii parțiale (complete în cazul translocațiilor Robertsoniene); frecvent, dezechilibrul cromozomial este important, și acești embrioni sunt eliminați ca avorturi spontane.

S-a stabilit că la 3-6% dintre cuplurile sterile sau cu avorturi spontane repetate unul sau altul din membrii cuplului prezintă o anomalie cromozomială echilibrată. În acest context, să reamintim că una din 400 de persoane aparent sănătoase din populație are o translocație, 1:1.000 prezintă o translocație Robertsoniană și 1:1.250 prezintă o inversie; deci cel puțin 4:1.000 de persoane sunt purtătoare de anomalii cromozomiale echilibrate ce pot da tulburări majore de reproducere.

3. Frecvența și cauzele anomaliilor cromozomiale

3.1. *Frecvența anomaliilor cromozomiale*

Frecvența anomaliilor cromozomiale la om este foarte mare comparativ cu alte specii. Deși estimările efectuate pe diferite categorii de celule și fenotipuri umane – de la gameți la nou-născuți și adulți (tabelul 7.7) – sunt dependente de metode și loturi, iar datele actuale sunt foarte probabil *subevaluări* ale fenomenului real, se poate conchide – fără rezerve – că anomaliile cromozomiale reprezintă o cauză importantă de morbiditate și mortalitate.

Anomaliile cromozomiale au fost detectate la:

- circa 10% dintre gameți, la persoane – bărbați și femei – normale și fertile;
- 3% dintre fetușii de 10 săptămâni și 2% dintre cei de 15-16 saptămâni;

Tabelul 7.7. Frecvențele aproximative ale anomaliilor cromozomiale în diferite situații clinice
(excluzând microdeleţiile detectate prin FISH)

Populație	Frecvența anomaliilor (%)
Spermatozoizi (bărbați normali și fertili)	4,5 - 22
Ovule (femei normale și fertile)	10 - 50
Toți zigoții	10 – 30
Embrioni în stadiul preimplantator (studii de fertilizare in vitro)	20 – 25
Sarcini recunoscute clinic (5 – 28 spt)	≥ 8
Avorturi spontane:	
Sarcini nerecunoscute clinic (≤ 4 spt)	90 (?)
Sarcini 5 – 8 spt	60
Sarcini 9 – 12 spt	12 – 32
Toate sarcinile recunoscute clinic (5–28spt)	≥ 30 – 35
Nou născuți morți (≥ 28 săptămâni)	5 – 6
Nou născuți vii	0.5 – 1
Decese neonatale și la sugari	5 – 7
Pacienți cu malformații congenitale	4 – 8
Pacienți cu malformații cardiace	13
Retard mintal (excluzând X fragil)	3 – 35
QI ≤ 20	3 – 10
QI = 20 – 49	12 – 35
QI = 50 – 69	3
Alte tulburări de dezvoltare neuropsihică	1 – 3 (?)
Sindromul X fragil	0.4
Hermafroditism adevărat	25
Bărbați - defecte în diferențierea sexuală	≤ 25
Femei - tulburări de dezvoltare pubertară	≤ 27
Sterilitate feminină	13
Bărbați sterili	5 – 15
Cupluri cu ≥ 3 avorturi spontane	2 – 5

Surse: Hooket, 1992; Jacobs, 1992; Hassold *et al.*, 1996; Eichenlaub-Ritter, 1996; Gardner și Southerland, 1996; Chandley, 1997; Garber *et al.*, 1997; Hsu, 1998; Mange, 1999.

- 50-60% dintre avorturile spontane precoce (15-25% dintre toate sarcinile);
- 10% dintre nou-născuții morți (1% dintre toate sarcinile);
- 0,7-1% dintre nou-născuții vii (> 1:120);
- 2% dintre sarcinile femeilor cu vârsta mai mare de 35 de ani în momentul concepției.

Incidența diferitelor tipuri de anomalii cromozomiale la nou-născuții vii este prezentată în tabelul 7.8. Se observă că *anomaliile neechilibrate*,

Tabelul 7.8. Incidența anomaliilor cromozomiale la nou-născuți
(Nielsen și Wohler, 1991; Hook, 1992; Hsu, 1998)

TIPURI DE ANOMALII	FRECVENȚĂ (‰)
Trizomii autozomale	1,40 – 2,09
Trizomie 13	0,04 – 0,09
Trizomie 18	0,13 – 0,29
Trizomie 21	1,20 – 1,69
altele	0,02 – 0,03
Aneuploidii gonozomale la băieți	2,75 – 2,91
47,XXY	1,00 – 1,73
47,XYY	1,00 – 1,18
altele	0,73 – 0,75
Aneuploidii gonozomale la fete	1,68 – 1,71
45,X și 45,X/46,XX	0,24 – 0,53
47,XXX	1,06 – 1,09
altele	0,09 – 0,36
Total aneuploidii gonozomale	2,3 – 2,41
Anomalii structurale echilibrate	2,04 – 4,30 (1/232 – 1/590)
Translocații reciproce	0,93 – 2,50
Translocații Robertsoniene	0,91 – 1,23
Inversii	0,19 – 0,80
Anomalii structurale neechilibrate	0,63 – 1,00
Anomalii autozomale neechilibrate (numerice și structurale)	2,04 – 4,00 (1/250 – 1/500)
Triploidii	0,02
TOTAL anomalii cromozomiale	6,48 – 8,30 (1/118 – 1/155)

numerice și structurale, reprezintă împreună aproape jumătate din totalul anomaliilor cromozomiale și deci numai *1 la 250 de nou-născuți au un fenotip anormal* produs de un dezechilibru cromozomial. Față de alte studii epidemiologice mai vechi, surprinde frecvența mai mare a anomaliilor structurale (5‰ dintre nou-născuți și 60% dintre toate anomaliile cromozomiale) și în mod deosebit a anomaliilor echilibrate 4,30‰ sau 1 la 232 de nou-născuți vii; acest fapt este firesc (anomaliile numerice produc mai frecvent un dezechilibru grav, letal) și reflectă indiscutabil sporirea calității metodelor de analiză citogenetică. Cert este că datele cuprinse în tabelele 7.7 și 7.8 sunt subestimări ale valorilor reale, deoarece nu includ sindroamele cu microdeleții identificabile prin FISH; numai sindromul velo-cardio-facial (del 22q11) are o frecvență de circa 1:2.000 nou-născuți, fiind probabil a doua anomalie cromozomială ca frecvență, după sindromul Down.

Datele actuale despre frecvența anomaliilor cromozomiale reprezintă un motiv în plus pentru a studia cauzele și mecanismele patogenice cu scopul de a identifica posibile intervenții profilactice. Din păcate, în acest domeniu nu s-au înregistrat progrese recente majore.

BCU "I. ST. CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Este cert doar faptul că etiopatogenia anomaliilor numerice diferă de cea a anomaliilor structurale.

Revenim astfel la prima idee a acestei secțiuni: chiar dacă 95% dintre produșii de concepție anormali sunt eliminați ca avorturi spontane, rata anomaliilor cromozomiale la nou-născuții vii (> 1:120) este *mai mare decât la alte specii. De ce?* Nu există explicații clare pentru această situație; exceptând efectul vârstei materne, se poate spune că nu există, foarte probabil, factori genetici și de mediu care să fie implicați semnificativ în producerea anomaliilor cromozomiale. Poate că frecvența lor ridicată reprezintă *„prețul pe care îl plătim pentru ceea ce am ajuns"*, pentru evoluția noastră la *Homo sapiens*, evoluție care a generat anumite particularități structurale și funcționale ale genomului uman.

„Cert este că medicii și publicul trebuie să se obișnuiască cu ideea că un anumit grad al perturbării reproducerii umane prin anomalii cromozomiale este... normal, iar eliminarea unui fetus anormal cromozomial este o selecție naturală... binevenită" (Dorothy Warburton, 1997).

3.2. *Cauzele și mecanismele de producere ale aneuploidiilor*

Cauzele aneuploidiilor produse prin erori de distribuție (nedisjuncție, pierdere anafazică) sunt încă neelucidate.

a) Nedisjuncția (ND) reprezintă o eroare de segregare (separare) a cromozomilor în anafaza meiozei (M I sau M II) sau mitozei. În **nedisjuncția meiotică** se produc gameți anormali (disomici și nulisomici) care, după fecundare, vor da zigoți cu aneuploidii: trisomie sau monosomie. În **nedisjuncția mitotică** se formează (în diferite momente ale dezvoltării) clone celulare aneuploide, ce vor evolua alături de celulele normale, formând un mozaic cromozomial. Ambele fenomene sunt frecvente și au consecințe importante; circa 5% din sarcinile recunoscute clinic prezintă trisomii sau monosomii, majoritatea fiind neviabile și eliminându-se prenatal, astfel că numai 0,7-1% din nou-născuții vii au o anomalie cromozomială; astfel, aneuploidia este cauza majoră de avorturi spontane sau nou-născuți cu anomalii congenitale și retard mental.

Nedisjuncția meiotică este mult mai frecventă în meioza maternă (ovogeneză), în special[16] în meioza I. Sunt totuși situații în care nedisjuncția meiotică paternă este regulă (de exemplu, trisomia XYY) sau este relativ frecventă (70% în monosomia 45,X; 50% în trisomia XXY). La aceste date clare se adaugă o altă constatare la fel de evidentă: riscul nedisjuncției crește odată cu creșterea vârstei reproductive materne, mai ales după 35 de ani. Studiile „clasice" au evidențiat acest fenomen în sindromul Down și alte trisomii, stabilind că la gravidele de 30 de ani riscul nașterii unui copil cu sindrom Down este de 1:1.000; el crește la 1:100 la 37 de ani și la 1:10 peste 45 de ani (vezi tabelul 11.2). Recent s-a determinat că riscul de aneuploidie în sarcinile recunoscute clinic crește de la 2-3% pentru femeile de 20 de ani la 30% sau mai mult la femeile de 40 de ani[17]. Mai trebuie făcută o precizare: în ciuda cercetărilor intense, *nu există nici o dovadă științifică care să susțină rolul posibil al unor factori externi în ND*: infecții virale, radiații, pesticide, medicamente, hormoni, contraceptive orale, cafea, alcool sau fumat etc.

Toate aceste date ridică firesc trei întrebări corelate: (1) de ce ND se produce mai frecvent în ovogeneză? (2) care sunt mecanismele și cauzele ND? (3) care sunt explicațiile creșterii frecvenței ND odată cu creșterea vârstei materne?

(1) La prima întrebare răspunsul ar putea fi, aparent, simplu: particularitățile meiozei la femeie, care începe în viața intrauterină și este discontinuă, ovocitele așteptând în dictioten 10-50 de ani pentru a-și finaliza meioza („ovulele au vârsta femeii"). Această perioadă lungă de „așteptare" ar predispune la erori de segregare în anfaza meiozei. În realitate fenomenele sunt mai complexe; recent s-a stabilit că erorile de segregare cromozomială se pot produce în toate etapele de dezvoltare ale ovocitelor:

- în ovarul fetal, fie în timpul proliferării mitotice a ovogoniilor (vezi mai jos *ipoteza Hulten*), fie în stadiul precoce de profază a meiozei I;
- în ovocitele oprite în dictioten;
- în stadiul final al maturării ovocitelor, după ovulație, când se reia meioza I.

Deci există foarte probabil cauze multiple și diferite tipuri de ND.

(2) Mecanismele ND sunt variate. Menținerea și reglarea coeziunii dintre cromatidele surori (care ține cromozomii recombinanți atașați până în anafaza meiozei I) este esențială pentru fixarea corectă pe fusul de diviziune și segregarea lor precisă. *Pierderea coeziunii între brațelor cromozomilor omologi ar fi cauza principală a ND deoarece generează disocierea lor prematură și segregarea întâmplătoare în meioza I.*

16. ND în meioza I este global de circa trei ori mai frecventă ca ND în meioza II; dar în unele trisomii, de exemplu trisomia 21, ND în meioza I se produce în peste 90% din cazuri.
17. Datele recente sunt concordante cu cele clasice deoarece în acest caz este vorba de produși de concepții aneuploizi și nu de „nou-născuți"; se știe că mulți fetuși aneuploizi se elimină ca avorturi spontane și deci numărul nou-născuților trisomici de exemplu este mult mai mic.

BCUAB CENTRALA LIBRARY

Studiile de genetică moleculară au permis identificarea a trei mecanisme posibile responsabile de nedisjuncția corelată cu vârsta maternă:

- *alterarea recombinării meiotice* prin *sinapsa prelungită* între cromozomii omologi în meioza I (datorită recombinărilor intra-cromozomiale localizate exclusiv centromeric sau telomeric), ce persistă în anafază și perturbă separarea cromatidelor surori determinând migrarea ambelor cromatide spre același pol al fusului de diviziune;
- *separarea precoce* a cromatidelor surori (în meioza II) ca o consecință, probabilă, a reducerii ratei recombinărilor intra-cromozomiale sau, mai probabil, datorită perturbării mecanismului de control al degradării coezinei centromerice;
- *anomalii ale fusului* de diviziune.

(3) Vârsta maternă crescută afectează diferit cele trei mecanisme menționate mai sus; perioada lungă de blocare în dictioten a meiozei (10-50 de ani) („ovulele au vârsta femeii") afectează foarte probabil „mașinăria meiotică" printr-un mecanism încă în mare parte necunoscut.

Nedisjuncția este influențată, foarte probabil, și alte cauze decât vârsta maternă reproductivă avansată, deoarece numai 25% dintre cazurile de sindrom Down se nasc din femei de peste 35 de ani. În ciuda cercetărilor intense, nu există nici o dovadă științifică ce ar putea susține rolul posibil al unor factori externi (infecții virale, radiații, medicamente, hormoni, contraceptive, cafea sau fumat, reducerea frecvenței raporturilor sexuale etc.).

Recent, Hulten *et al.* (2010) au formulat o nouă ipoteză privind efectul vârstei materne în trisomia 21, pe baza demonstrării existenței unui mozaicism 46/47,+21 în ovogoniile ovarului fetușilor normali. În contrast cu ipoteza curentă a ND primare a cromozomului 21 în anafaza meiozei I a ovocitelor normale, ovogoniile trisomice (produse prin ND mitotică primară) care încep meioza ar produce, printr-o nedisjuncție secundară, ovocite disomice 21, care după fecundare produc zigoți cu trisomie 21. Efectul vârstei materne este explicat prin acumularea în timp a acestor ovocite anormale[18]. Autorii susțin cu argumente că acest model este compatibil cu datele actuale privind anomaliile de recombinare și segregarea menționate mai sus.

Progresele realizate în generarea de modele animale, în diagnosticul preimplantator și în analiza celulelor tumorale au permis evidențierea unor cauze ce intervin, cu o mare probabilitate, în apariția anomaliilor cromozomiale numerice în specia umană. Până la confirmarea acestor date noi, cert este faptul că anomaliile cromozomiale sunt rezultatul unui fenomen multifactorial care trebuie „disecat" în toate componentele sale moleculare pentru a identifica corect factorii de risc. Identificarea proteinelor și mecanismelor moleculare ce intervin în cele trei evenimente ale profazei I (împerecherea, sinapsa, recombinarea) precum și în segregare ar putea clarifica mecanismele nedisjuncției meiotice și, poate, pe această bază, preveni consecințele ei majore.

b) Instabilitatea mitotică a primelor diviziuni ale zigotului pare a fi cauza principală a dezechilibrelor cromozomiale ce determină avorturile spontane precoce și mozaicismele placentare.

Primele diviziuni mitotice se suprapun unei etape importante a dezvoltării embrionare și anume cea a transferului controlului dezvoltării embrionare de la genomul matern către genomul embrionului. În embrionul nou format genomul matern este reprezentat de molecule de ARNm sau proteine ce au fost sintetizate în cursul formării ovocitului; dintre acestea, unele au efect regulator asupra dezvoltării embrionului, genele ce le codifică fiind numite *gene cu efect matern*. Un exemplu de astfel de genă este *Filia*, genă a cărei absență determină, la șoarece, anomalii morfologice și funcționale ale fusului de diviziune cu întârziere metafazică, formare de micronuclei și aneuploidii. În ciuda numeroaselor studii realizate la om, argumentele privind implicarea unor gene umane sunt, deocamdată, doar indirecte.

Prezența de celule aneuploide într-un embrion de numai câteva celule poate avea un efect perturbator important asupra dezvoltării embrionare ducând fie la neimplantare, fie la letalitate embrionară. Studiile efectuate în cadrul diagnosticului preimplantator au arătat că proporția de embrioni prezentând anomalii cromozomiale este foarte importantă, variind, în funcție de studiu, de la 50% până la 90% din embrioni. Anomaliile cromozomiale identificate sunt foarte variate, atât de număr, cât și de structură, adesea embrionul fiind un mozaic cu anomalii cromozomiale diferite. Procentul de numai 10% de embrioni fără anomalii cromozomiale este inferior ratei succesului reproducerii umane și demonstrează, că, cel puțin în unele situații, există o „corectare" spontană a anomaliei datorată, foarte probabil, avantajul proliferativ pe care îl au blastomerele normale.

Aceste elemente sugerează interesul limitat pe care îl are diagnosticul preimplantator prin tehnica FISH (cu excepția, bineînțeles, a anomaliilor cromozomiale ce pot rezulta din dezechilibrul meiotic al unei anomalii cromozomiale echilibrate parentale) știind că, în mod normal:

18. Acest model explică și riscul de recurență (mic, de circa 1%) a trisomiei 21 libere în aceeași familie care anterior era explicat prin existența ipotetică a unor gene ce predispun la ND.

BCU CLUJ UNIVERSITATEA

- sunt prelevate pentru a fi analizate doar unul-două blastomere, ceea ce nu poate exclude prezența de anomalii cromozomiale în restul celulelor neanalizate;
- sunt folosite doar câteva sonde FISH, numărul lor fiind ridicol de mic față de larga gamă a anomaliilor cromozomiale posibile.

c) Anomaliile atașării cromozomilor la fibrele fusului de diviziune (*atașarea merotelică*) reprezintă o cauză importantă de aneuploidie, în special pentru celulele în cultură. Atașarea merotelică este reprezentată de atașarea la kinetocor a fibrelor fusului de diviziune provenind de la cei doi poli, situație care, în mod normal, este corectată înaintea intrării în anafază. Dacă acest tip de atașare persistă (datorită defectelor punctului de control al fusului de diviziune) se produc perturbări în migrarea cromatidei: fie migrarea spre polul cu numărul cel mai mare de fibre atașate, situație ce poate genera fie o segregare corectă, fie o aneuploidie prin nondisjuncție, fie (în cazul în care numărul de fibre cu origine la cei doi poli este sensibil egal) o aneuploidie prin întârziere anafazică.

d) Pierderea parțială a funcției punctului de control al fusului de diviziune este o altă cauză ce poate genera anomalii cromozomiale numerice. Acest punct de control, regulat de proteine codificate de numeroase gene cum ar fi *MAD2*, *BUBR1*, *RAE1*, *BUB1*, *BUb3*, *CENP-E*, împiedică intrarea în anafază atât timp cât atașarea corectă a cromozomilor la fibrele fusului de diviziune nu a fost realizată și o tensiunea mecanică nu este exercitată la nivelul centromerilor. Pierderea completă a funcției acestui punct de control este letală, însă celulele cu inactivare parțială sunt viabile și prezintă, în unele cazuri, o predispoziție la transformarea tumorală.

e) **Amplificarea centrozomilor** este un alt mecanism ce poate determina apariția de anomalii cromozomiale numerice, mecanism ce este însă specific celulelor tumorale. În mod normal, în faza S a ciclului celular este inițiată duplicarea centrozomului permițând organizarea bipolară, normală, a fusului de diviziune. În cazul amplificării, duplicarea este perturbată și centrozomi suplimentari se formează generând fusuri de diviziune multipolare ce vor împiedica segregarea normală a cromozomilor.

3.3. *Cauzele anomaliilor cromozomiale de structură*

Cauzele anomaliilor cromozomiale de structură par, la prima vedere, mai clare, deoarece mecanismul lor clasic de producere implică *ruperea* cromozomilor și *reunirea anormală* a capetelor cromozomilor rupți. Această simplicitate este numai aparentă deoarece producerea anomaliilor cromozomiale de structură necesită acțiunea sinergică a patru categorii de factori: proximitatea spațială a regiunilor implicate în rearanjarea cromozomială, producerea de rupturi ale moleculelor de ADN, recombinarea sau repararea inadecvată a rupturilor ADN și caracteristici particulare ale anumitor secvențe de ADN sau ale cromatinei. În aceste condiții, structura particulară a genomului uman pare a fi sursa principală a erorilor de recombinare sau reparare și deci a anomaliilor structurale.

a) Proximitatea spațială (în nucleu) a regiunilor cromozomiale implicate în apariția anomaliilor de structură, în special în cazul anomaliilor recurente, este esențială, procesul de reparare utilizând capetele libere de ADN situate unul în apropierea celuilalt.

Este știut că fiecare cromozom ocupă, în nucleul interfazic, o poziție definită numită *teritoriu cromozomial*. Dispoziția teritoriilor cromozomiale este însă dinamică, ea putând varia în funcție de fazele ciclului celular, de tipul celular sau de activarea funcțională a celulei de către factori extracelulari (hormoni, factori de creștere etc.). Astfel, proximitatea cea mai strânsă între genele *PML* și *RARA* (gene a căror fuziune este caracteristică leucemiei promielocitare) sau *BCR* și *ABL* (gene a căror fuziune este caracteristică leucemiei mieloide cronice) a fost observată la tranziția dintre fazele S și G2. Tipul celular influențează, de asemenea, distanța intergenică: în celulele $CD34^+$ (populație ce corespunde celulelor sușă hematopoietice) distanța medie dintre genele *BCR* și *ABL* este mai redusă decât cea între genele *PML* și *RARA*.

b) Producerea de rupturi ale moleculelor de ADN este determinată de diferite forme ale stresului celular. Acesta poate fi indus de o serie de factori ca agenții genotoxici, stresul oxidativ sau replicativ sau procesul de transcripție.

Agenții genotoxici (agenți numiți și „clastogeni"), cum sunt radiațiile ionizante sau unele substațe chimice, sunt agenți ce produc rupturi dublu catenare ale moleculei de ADN. *Stresul oxidativ* este determinat de un dezechilibru între producerea și degradarea de specii reactive de oxigen (ROS – *Reactive Oxygen Species*). În fiecare zi, aproximativ 2×10^4 alterări ale moleculelor de ADN sunt produse în fiecare celulă prin acest mecanism. *Stresul replicativ*, reprezentat de anomaliile replicării ADN ce determină diminuarea vitezei de replicare, blocarea sau colapsul furcii de replicare, poate fi determinat de depleția unui precursor nucleotidic, absența unor enzime necesare replicării sau de prezența unor secvențe particulare ale ADN ce modifică structura secundară a moleculei de ADN. Două mecanisme replicative de formare a anomaliilor cromozomiale sunt bazate pe colapsul furcii de replicare și prezența de microhomologii: MMBIR (*Microhomology-Mediated Break-Induced Replication*) și FoSTeS (*Fork Stalling and Template Switching*).

BCUJ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Procesul de transcripție poate induce rupturi bicatenare la nivelul promotorilor genelor, ca în cazul genelor a căror transcripție este indusă de hormonii estrogeni sau androgeni.

c) Recombinarea sau repararea inadecvată a rupturilor dublu catenare ale moleculelor de ADN poate fi explicată prin anomalii ale unuia din următoarele mecanismele: recombinarea neomoloagă (NHEJ – *NonHomologous End Joining*), recombinarea omoloagă alelică sau nonalelică sau activarea inadecvată a enzimelor sau complexelor proteice implicate în mod normal în generarea de rearanjări genomice – enzima AID (*Activation-Induced cytidine Deaminase*) și complexul proteic RAG (*Recombination Activating Gene*) implicate fiziologic în generarea diversității imunoglobulinelor sau receptorilor T și responsabile de apariția translocațiilor reciproce t(14;18) *BCL2*-IGH și t(8;14) IGH-*MYC* specifice limfomului folicular și, respectiv, limfomului Burkit.

d) Particularitățile secvenței ADN sau caracteristicile cromatinei din anumite regiuni cromozomiale, cum sunt prezența de structuri non B ale ADN (ADN-Z, ADN triplu-helix sau structuri cruciforme), prezența de dinucleotidele CpG sau elementele repetate (secvențe *Alu*, LINE, transpozoni) și modificările cromatinei (epigenetice) ce favorizează acțiunea factorilor generatori de rupturi dublu catenare, pot participa la apariția rupturilor dublu catenare ale ADN.

D. Polimorfismele genetice

Două genomuri umane alese la întâmplare sunt identice între ele în proporție de 99,9%. Restul de 0,1% conține variante genetice sau versiuni diferite (*alele*) ale unei secvențe de ADN, situate într-o anumită poziție (*locus*) din cromozomi, care ar rezulta în urma unor mutații. Când anumite variante genetice – alele – sunt frecvente și se găsesc la mai mult de 1% din populația generală, atunci ele se constituie ca **polimorfisme genetice**. În contrast, alelele cu o frecvență mai mică de 1% sunt numite, prin convenție, *variante rare*. Aceste denumiri au fost alese pentru a permite diferențierea lor de *mutații*, termen care implică *per se* un efect negativ asupra proteinei și, respectiv, asupra caracterului fenotipic corespunzător, deși mecanismul de producere este similar. În prezent, există tendința unificării tuturor acestor termeni sub denumirea largă de **variante genetice**.

Polimorfismele genetice sunt responsabile pentru cea mai mare parte din *diversitatea* și individualitatea fenotipică observate în cadrul speciei umane. Aceste variații genetice pot fi localizate oriunde în genom, atât în interiorul genelor, cât și în regiunile intergenice. Evident, numai acele polimorfisme existente la nivelul genelor au potențialul de a asocia modificări fenotipice. De aceea, primele polimorfisme genetice au fost identificate indirect, prin studiul variațiilor existente la nivelul proteinelor codificate. Ulterior însă, a devenit clar că acest *fenomen este mult mai amplu*, deoarece toate polimorfismele rezultă, în ultimă analiză, prin modificări în secvența de ADN. Dincolo de interesul teoretic, mai ales în studiile de genetică populațională (vezi capitolul 8), identificarea sistematică a polimorfismelor umane s-a dovedit a avea numeroase aplicații practice; vom menționa doar utilizarea lor: în transfuzii sangvine și transplante; identificarea de persoane, în criminalistică; stabilirea paternității; diagnosticul genotipic indirect prin folosirea unor markeri genetici.

1. Polimorfismele proteice

Primele informații privind diversitatea genetică dintre indivizii umani au fost obținute prin studiul variantelor proteice existente în populație. Primele polimorfisme au fost identificate încă de la începutul secolului trecut prin analiza așa-numitelor antigene de grup sangvin, precum cele din sistemele AB0 și Rh. Ulterior au fost evidențiate și alte polimorfisme antigenice, prin studiul unor sisteme mai rare de grup sangvin (MNSs, Lutheran, Lewis, Xg etc.) și, mai recent, al sistemului HLA, considerat cel mai polimorfic sistem genetic uman (vezi capitolul 17). Prin studiul mobilității electroforetice, al activității enzimatice și al diferitelor proprietăți fizico-chimice, s-a evidențiat polimorfismul unor *proteine serice* (haptoglobina, transferina, alfa-1-antitripsina, imunoglobulinele, ceruloplasmina etc.), al unor *enzime eritrocitare* (fosfataza acidă-1, G6PD, esteraza D, fosfoglucomutazele), *serice* (colinesteraza-1, TGP etc.) și *tisulare* (alcool-dehidrogenaza, acetil-transferaza hepatică etc.)

A devenit astăzi clar că doi indivizi aleși la întâmplare din populația generală pot prezenta diferențe structurale la nivelul a circa 20% din totalul proteinelor. Cu cât indivizii sunt mai îndepărtați din punct de vedere genetic (grupuri etnice diferite), cu atât gradul de diversitate este mai pronunțat. Toate sistemele genetice polimorfice se găsesc în populație în mai multe variante; un individ posedă însă numai

o anumită variantă dintr-un sistem. Datorită numărului mare de sisteme polimorfice (>30) şi de variante în fiecare sistem, se poate realiza un număr imens de combinaţii şi *fiecare individ posedă o combinaţie specifică de variante, este un unicat biologic*. Aceste date au demonstrat fără echivoc conceptul de „individualitate chimică" emis de către Sir Archibald Garrod cu un secol în urmă. Înţelegerea individualităţii genetice şi biologice este piatra fundamentală a abordării genetice în medicina practică, exprimate prin dictonul: *„nu există boli, ci numai bolnavi"*. Având în vedere atât valoarea istorică, cât şi valoarea practică deosebită, vom prezenta, succint, în continuare câteva elemente care stau la baza diversităţii sistemelor de grup sangvin AB0 şi Rh şi a proteinei serice alfa$_1$-antitripsină.

1.1. Polimorfismul sistemului de grup sangvin AB0

Sistemul de grup sangvin AB0 a fost descris pentru prima dată de către Landsteiner în 1900, iar premiul Nobel pe care l-a primit se justifică prin rolul major pe care îl are acesta în transfuziile de sânge şi în transplanturile de organe.

Bazele moleculare ale sistemului de grup AB0 au început a fi înţelese relativ recent (vezi capitolul 4.B.5.). Antigenele A, B, H eritrocitare sunt glicosfingolipide complexe care au o parte centrală fixată cu un capăt în membrana eritrocitului; pe acest „miez" se leagă lateral, în zona extramembranară, mai multe catene glucidice. Specificitatea antigenică este determinată de glucidul terminal.

Prima etapă în formarea acestor antigene (vezi figura 4.9) este rezultatul intervenţiei unei enzime numită *fucozil transferaza* (codificată de gena *FUT1* localizată pe cromozomul 19) care determină adiţia unor grupări de fucoză la miezul proteic. Rezultatul acestei etape este formarea antigenului H. Etapa a doua este catalizată de enzima *glicoziltransferaza* (codificată de gena *AB0* de pe cromozomul 9q34) care prezintă în populaţia generală două variante alelice majore, codominante, A şi B şi o variantă recesivă, 0. Varianta alelică A determină adiţia la antigenul H a unui rest de N-acetilgalactozamină, cu formarea antigenului A, în timp ce varianta alelică B are afinitate mai crescută pentru adiţia unui rest de D-galactoză, ceea ce transformă antigenul H în antigen B. Varianta alelică 0 a suferit o mutaţie nonsens care determină sinteza unei enzime inactive, care nu modifică substanţa H; ca urmare, eritrocitele vor prezenta pe suprafaţa lor antigene H.

Odată cu clonarea genei pentru glicoziltransferază a putut fi analizat substratul molecular al diferenţelor care există între alelele A, B şi 0. Între secvenţa alelelor A şi B există o diferenţă de patru nucleotide care produc modificări de secvenţă ale aminoacizilor ce modifică specificitatea glicozil transferazei codificată de gena *AB0*. Alela 0 are deleţia unei perechi de baze care produce o mutaţie cu schimbarea cadrului de lectură, ce suspendă activitatea transferazei mutante. Deci „mici" modificări din structura genei vor determina alele polimorfice care conduc la substituţia unor aminoacizi din structura enzimei şi modificarea afinităţii pentru resturile glucidice. În fapt au fost evidenţiate numeroase subgrupuri sangvine precum A2, Ax sau B3 determinate de asemenea de diferenţe genetice la nivelul regiunilor codante şi producerea a peste 70 de alele. Se adaugă şi variaţii genetice la nivelul regiunilor reglatorii 5' şi 3' precum şi numeroase variaţii genetice la nivelul intronilor.

1.2. Polimorfismul sistemului de grup sangvin Rh

Denumirea *sistemului Rh* provine de la maimuţele *Rhesus* care au fost utilizate în experimentele ce au dus la descoperirea acestei grupe sangvine. Sistemul de grup sangvin Rh conţine 50 de antigene, dintre care numai cinci antigene **D**, **C**, **c**, **E** şi **e** sunt mai importante. Termenii uzitaţi de: *factor Rh*, *Rh pozitiv* şi *Rh negativ* – se referă numai la antigenul D, cel mai puternic (imunogenic) antigen; el are un rol important în transfuziile de sânge precum şi în *boala hemolitică a nou-născutului* (*„eritroblastosis fetalis"*).

Din punct de vedere fenotipic, populaţia generală este împărţită în două categorii majore: indivizii Rh pozitivi (Rh+), care exprimă pe suprafaţa eritrocitelor antigenul RhD, numit şi factor Rh, (aproximativ 85% din populaţia caucaziană) şi indivizii Rh negativi (Rh–), care nu exprimă acest antigen (15%). Spre deosebire de sistemul AB0, indivizii Rh negativi nu prezintă spontan anticorpi anti-RhD în ser. În schimb, aceşti anticorpi se pot dezvolta accidental la persoane Rh negative ca urmare a contactului cu sângele Rh pozitiv care determină imunizarea persoanelor respective. Acest proces are o semnificaţie deosebită în cazul transfuziilor de sânge şi în cazul bolii hemolitice a nou-născutului.

Boala hemolitică a nou-născutului este o afecţiune care poate apărea la copiii Rh pozitivi născuţi din mame Rh negative. În mod normal, în cursul sarcinii, mici cantităţi de sânge fetal pot traversa bariera placentară, determinând imunizarea mamei Rh negative. Anticorpii materni necesită un interval de timp pentru formare, astfel încât, de regulă, prima sarcină decurge fără probleme. Atunci când mama a fost imunizată anterior primei sarcini sau în cursul unei a doua sarcini cu feţi Rh pozitivi, anticorpii anti-RhD de la

mamă pot traversa bariera placentară către făt, în special spre sfârşitul sarcinii, determinând hemoliza eritrocitelor fetale. Rezultatul este icterul pronunţat şi, în formele severe, insuficienţa cardiacă congestivă. Afecţiunea poate fi prevenită în prezent prin administrarea la femeile Rh negative de imunoglobuline împotriva anticorpilor anti-RhD, după fiecare sarcină cu făt Rh pozitiv.

Proteinele care poartă antigenele Rh sunt proteine transmembranare, a căror structură sugerează că sunt *canale ionice*. Antigenele principale D, C, E, c şi e sunt codificate de două gene adiacente situate pe braţul scurt al cromozomului 1 (1q36,13-p34.3) gena *RHD*, ce codifică proteina RhD (purtătoare a antigenului RhD) şi gena *RHCE*, care codifică proteina RhCcEe (purtătoare a antigenelor *C* sau *c* şi *E* sau *e*); în sinteza antigenelor mai intervine gena *RHAG* (*Rh associated glycoprotein*), localizată pe cromozomul 6p, care codifică o glicoproteină.

Proteinele Rh sunt exprimate pe suprafaţa eritrocitelor numai dacă proteina RhAG este de asemenea prezentă. La toate acestea se adaugă şi o serie de proteine Rh accesorii şi toate împreună formează „complexul Rh". Indivizii Rh pozitivi prezintă antigenul major al acestui sistem: RhD. De regulă, indivizii Rh negativi de origine caucaziană şi aproximativ 20% din cei cu ascendenţă africană prezintă o deleţie a întregii gene *RHD*, restul indivizilor Rh negativi prezentând alele nule rezultate fie din recombinarea genelor *RHD* şi *RHCE*, fie ca urmare a mutaţiilor de tip nonsens. În schimb, diferenţele care există între alelele C şi c, respectiv E şi e sunt rezultatul unor polimorfisme mononucleotidice care conduc la substituţia unor aminoacizi în structura proteinei RhCcEe.
Monitorizarea sarcinilor la femeile Rh negative impune administrarea de imunoglobuline împotriva anticorpilor anti-RhD la fiecare sarcină dacă genotipul fătului nu este cunoscut. Identificarea alelelor *RHD* ale fătului (cu evitarea unui tratament profilactic ce nu este necesar) poate fi realizată prin tehnici de genetică moleculară folosind celule fetale obţinute prin biopsie de vilozităţi coriale sau prin amniocenteză. Recent a fost pusă la punct o tehnică de diagnostic neinvaziv bazată pe genotiparea ADN-ului fetal liber circulant în sângele matern.

1.3. Polimorfismul alfa$_1$-antitripsinei

Alfa 1-antitripsina (A1AT) este o proteină serică de fază acută, aparţinând superfamiliei **serpinelor**, produsă în principal de hepatocite (sub acţiunea mediatorilor inflamaţiei) şi eliberată în circulaţia sangvină de ficat. A1AT este principalul inhibitor al proteazei (Pi)[19] care protejează ţesuturile de acţiunea enzimelor inflamatorii, în special faţă de *elastaza* eliberată de neutrofile în procesul inflamaţiei.

Gena ce codifică A1AT numită şi *SERPINA1* este localizată într-o regiune (*cluster*) pe cromozomul 14q31-32.3 ce cuprinde şi gene pentru alte serpine (antitrombina III, inhibitorul complementului 1 ş.a.), care au o structură parţial omoloagă cu *SERPINA1*. Gena prezintă peste 100 de alele mutante diferite, cu activitate antitripsinică variată. Alela normală este denumită M. În populaţia vest-europeană cele mai frecvente mutaţii sunt Z (Glu342Lys) şi S (Glu264Val); ele produc agregarea spontană a moleculelor de A1AT în reticulul endoplasmatic hepatic şi astfel scad secreţia de proteină din celulele hepatice în circulaţie (deficienţă de A1AT) şi produc acumularea proteinei nesecretate în celulele hepatice (cauzând hepatită şi ciroză). Genotipurile ce includ aceste mutaţii codominante (MS, MZ, SS, SZ şi ZZ) au un nivel redus de activitate A1AT (PiZZ ce determină deficienţa severă de A1AT are un nivel de doar 10-15% din nivelul normal al A1AT)[20].

Mutaţiile genei care codifică A1AT determină două efecte importante:

- reduc nivelul enzimei în ser (deficienţă de A1AT) şi atunci elastaza, eliberată de neutrofile în procesul inflamator, distruge elastina fibrelor de ţesut conjunctiv din plămâni, producând (mai ales la fumători[21]) complicaţii respiratorii, emfizem sau boala pulmonară obstructivă cronică (BPOC);
- polimerizează A1AT nefuncţională în celulele hepatice, producând hepatită şi ciroză hepatică infantilă.

O formă foarte rară de A1AT (numită Pi Pittsburg) funcţionează ca antitrombină (o serpină înrudită) şi generează diateze hemoragice.

2. Polimorfismele ADN

După cum am precizat anterior, analiza la nivel proteic permite numai identificarea unei minorităţi a polimorfismelor genetice şi anume a acelora care determină modificarea secvenţei aminoacizilor asociată, adesea însă nu obligatoriu, cu o variaţie mai mult sau mai puţin importantă a funcţiei proteinei. Majoritatea

19. A1AT mai este denumită *inhibitor al alfa-1 proteinazei* (A1PI) sau *proteaz-inhibitor* (Pi) deoarece inhibă o varietate de proteaze; o altă denumire pentru A1AT este SERPINA 1.
20. Prevalenţa în populaţia vest-europeană a fenotipului PI ZZ a fost estimată între 1:2.500 şi 1:5.000 nou-născuţi.
21. Fumul de ţigară oxidează metionina din poziţia 358 a A1AT care are un rol esenţial în fixarea la elastază.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA

polimorfismelor genetice sunt silențioase fenotipic; de aceea amploarea lor a putut fi evaluată doar atunci când a fost posibilă compararea secvențelor nucleotidice provenind de la indivizi diferiți. Astfel, publicarea secvenței genomului uman urmată, doar la numai câțiva ani distanță, de secvențializarea mai multor genomuri personale provenind de la indivizi cu origine etnică diferită, constituie evenimentele ce marchează punctele de plecare în studiul pe scară largă al variațiilor genetice și, implicit, a polimorfismelor genetice.

Este important de menționat că secvențele succesive de referință ale genomului uman sunt „secvențe fictive" sau, mai bine zis, „secvențe mozaic" rezultând din asamblaje de blocuri de secvențe provenite de la donatori diferiți. Astfel, multe regiuni genomice sunt reprezentate, în fapt, de variante alelice rare, specifice donatorului. O primă „variantă corectată" a genomului uman de referință (GRCh37), versiune ce include câteva variante comune, a fost publicată în 2009 de *Genome Reference Consortium* (GRC). Deși obiectivele acestui consorțiu multinațional sunt aparent simple (corectarea erorilor de asamblaj, secvențializarea regiunilor rămase încă nesecvențiate și producerea de secvențe alternative pentru regiunile cu variabilitate ridicată) realizarea lor va necesita câțiva ani și importante resurse financiare.

Variațiile identificate în genomul uman sunt clasificate în funcție de mărimea fragmentului de ADN implicat (vezi figura 7.31).

- Cea mai simplă formă, cunoscută și sub numele de **variații de secvență**, este modificarea unui *singur nucleotid* fie prin substituția sa, reprezentată de **SNV** (*Single Nucleotide Variation*) sau de **SNP** (*Single Nucleotide Polymorphism*), variații denumite astfel în funcție de frecvența lor în populație,

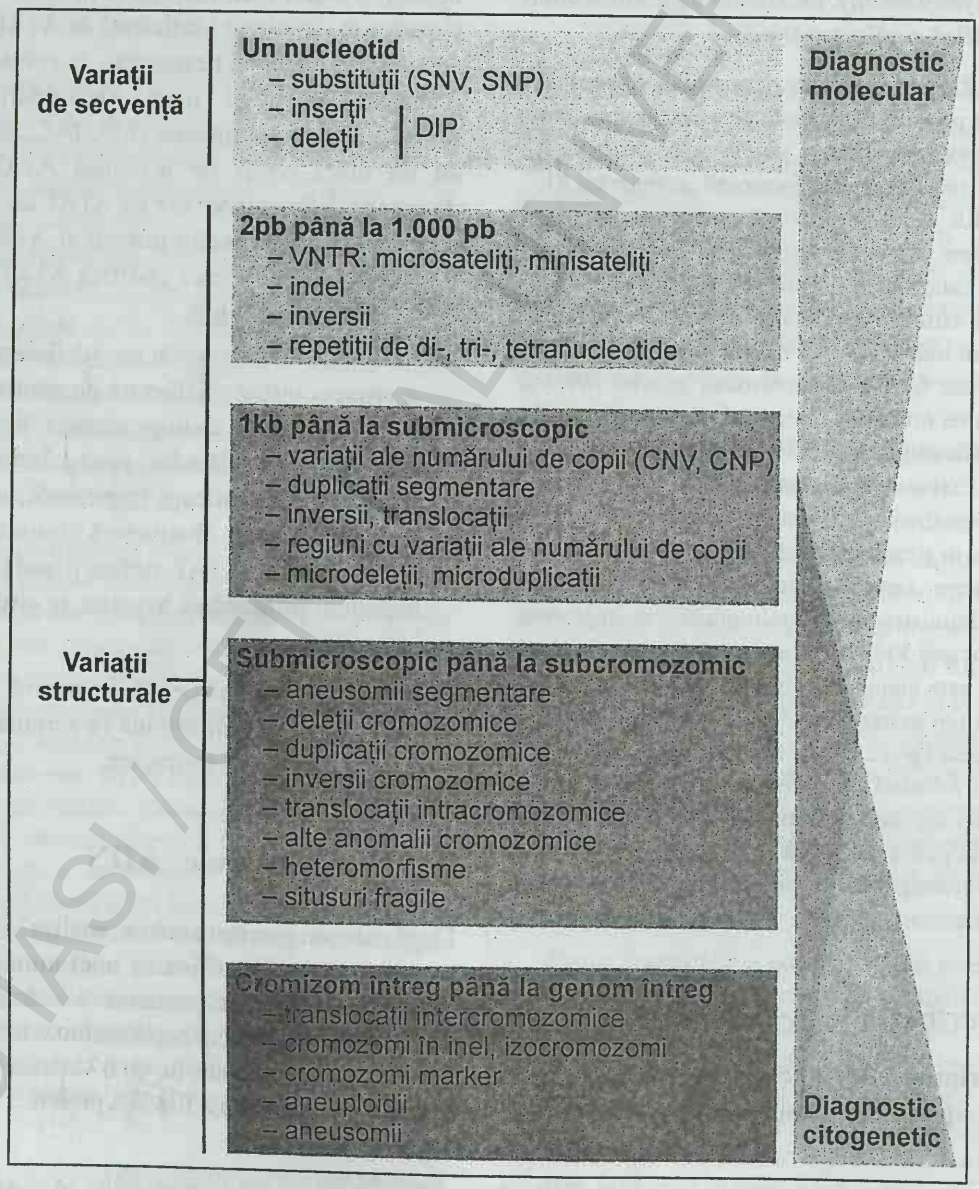


Figura 7.31. Clasificarea variațiilor identificate în genomului uman
(adaptată după Scherer *et al.*, 2007)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fie prin **inserția/deleția** unui nucleotid (variații grupate sub denumirea de **DIP** – *one base pair Deletion/Insertion Polymorphism*).

- Variațiile fragmentelor de ADN mai mari decât un nucleotid sunt grupate în categoria **variantelor structurale**.
  - Astfel, **variațiile fragmentelor cuprinse între 2 și 1.000 nucleotide** includ *polimorfismele microsateliților și minisateliților, inserțiile și delețiile mai mici de 1.000 nucleotide* (incluse în categoria generică de *indel*) precum și mici *inversii*.
  - **Variațiile submicroscopice** (între 1.000 de nucleotide și câteva megabase, nedetectabile prin tehnicile de citogenetică convențională) includ *variațiile numărului de copii* (CNV și CNP – *Copy Number Variation* și *Copy Number Polymorphism*), *inversiile, translocațiile submicroscopice, microdelețiile* și *microduplicațiile.* Unele dintre aceste variații au caracter patogen și se pot încadra în categoria mutațiilor cromozomiale, altele reprezintă doar polimorfisme cu frecvențe variabile în populație.
  - **Variațiile microscopice**, cromozomiale sau genomice cuprind variații încadrate în grupul polimorfismelor (*heteromorfismele cromozomiale*, unele *inversii* și unii *cromozomi marker*) sau variații patogenice.

Recent au fost inițiate mai multe proiecte internaționale (caseta 7.4) cu scopul de a identifica o proporție cât mai mare a diferitelor tipuri de variații ce caracterizează genomul uman și, indirect, de a ameliora secvența genomului uman de referință:

- **proiectul *HapMap***, axat pe identificarea markerilor SNP comuni, cu o frecvență în populație ce depășește 5%;
- **proiectul *1000 Genomes***, centrat pe identificarea diferitelor variante genetice cu o frecvență mai mare de 0,5-1%;
- ***Human Variome Project***, axat pe constituirea unei baze de date cuprinzând variațiile cu efect patogenic (mutații) ale tuturor genelor.

2.1. *Polimorfismele unui singur nucleotid (SNPs)*

Polimorfismele mononucleotidice sau prescurtat SNPs (se pronunță „*snips*") sunt variații de secvență care produc într-un anumit situs două alele alternative: –CGA**C**G– și –CGA**T**G–.

SNPs au fost descoperite inițial prin digestia cu endonucleaze de restricție care recunosc o secvență nucleotidică specifică și secționează ADN la acest nivel. Clivarea moleculei de ADN cu o anumită enzimă de restricție „fragmentează" ADN într-un număr definit de fragmente, de o anumită lungime, corespunzătoare distanței dintre două situsuri de restricție (vezi capitolul 5.A.1). Deoarece SNPs pot anula un situs de restricție sau crea un situs nou, modificând distanța dintre două situsuri, după digestia cu endonucleaze se produc fragmente cu lungimi diferite (acestea sunt evidențiate prin Southern blot, după hibridarea cu o sondă corespunzătoare unei părți din fragmentul respectiv; vezi 5.B.1 și figura 7.32). Acest polimorfism a lungimii fragmentelor de restricție („*restriction fragment length polymorphism*") a fost numit **RFLPs** se pronunță „*reflips*"). Fragmentele de lungimi diferite constituie *alele codominante* ale locusului ADN respectiv. În practică, RFLPs s-au folosit un timp în diagnosticul genotipic indirect, deoarece anumite alele ale unui locus marker se pot transmite strâns înlănțuite cu o alelă mutantă.

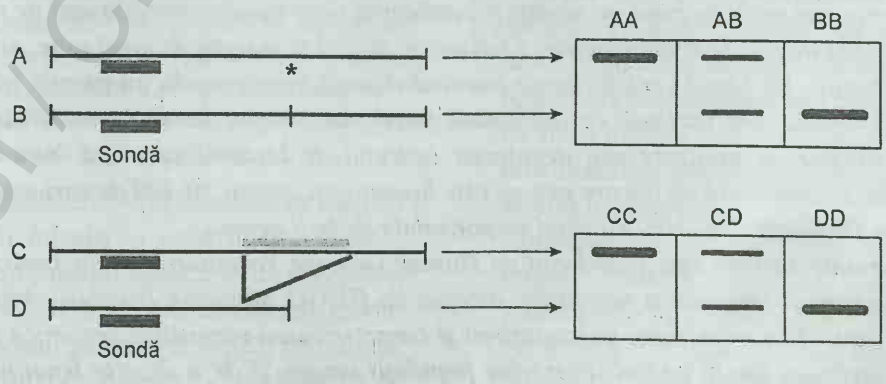


Figura 7.32. Polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție evidențiat prin hibridizarea ADN (Southern blot)

(după Nussbaum *et al.*, 2001)

Legendă: A – alelă cu situs de restricție (*) anulat/absent; B – alelă normală; C – alelă cu inserție nucleotidică; D – alelă, ci deleție nucleotidică

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 7.4

Proiecte internaţionale pentru studiul polimorfismelor ADN

***Proiectul internaţional HapMap**, lansat în octombrie 2002, are ca scop identificarea şi catalogarea variantelor comune de tip SNP prezente în genomului uman la nivelul mai multor populaţii. Proiectul se desfăşoară în trei faze:*

- *faza I, de genotipare a 1 milion de SNP (un SNP la aproximativ fiecare 5 kb) la 269 de indivizi provenind din patru populaţii diferite: populaţia din Utah cu ascendenţă europeană (CEU), populaţie Yoruba din Ibadan, Nigeria (YRI), populaţia Han din Beijing, China (CHB) şi japonezi din Tokyo (JPT).*
- *faza II, de genotipare a unui număr şi mai mare de SNP-uri (în total 3,9 milioane, reprezentând un SNP la fiecare kb), în special în zonele în care densitatea iniţială era redusă. Primele două faze sunt deja finalizate, rezultatele obţinute fiind puse în mod liber la dispoziţia întregii comunităţi ştiinţifice.*
- *faza III, de extindere a genotipării la şapte alte populaţii: Maasai şi Luhya din Kenya, italieni din Toscania, indieni Gujarati din Houston, Texas, indivizi cu ascendenţă mexicană din Los Angeles, chinezi din Denver şi afro-americani din sud-vestul SUA.*

Efortul internaţional de identificare a noi SNP prin secvenţializare şi de genotipare este colosal, permiţând atât confirmarea SNPs deja descrise, cât şi identificarea de noi SNPs pentru:

- *a oferi o acoperire cât mai bună a genomului;*
- *a determina frecvenţa fiecărui SNP în diferite populaţii;*
- *a delimita blocurile de înlănţuire genetică şi a calcula frecvenţele lor de recombinare;*
- *a identifica SNP neredundante ce caracterizează cel mai bine blocurile de legătură genetică (SNP numiţi tagSNP – haplotype tagging SNP).*

***Proiectul internaţional 1000 Genomes**, lansat în 2007, este finanţat şi coordonat de Wellcome Trust–Sanger Institute din Marea Britanie, Beijing Genomics Institute din Shenzhen, China şi National Human Genome Research Institute din Statele Unite. El îşi propune, prin secvenţializarea a peste 2.000 genomuri aparţinând unor persoane cu origine etnică foarte variată, să identifice şi să catalogheze toate variantele de tip SNP, indel, CNV şi inversii cu o frecvenţă globală mai mare de 1%, coborând până la 0,1-0,5% la nivelul genelor. Pe lângă contribuţia directă în identificarea şi cuantificarea acestor variaţii, acest proiect va permite ameliorarea genomului uman de referinţă, identificarea regiunilor supuse selecţiei precum şi înţelegerea mecanismelor implicate în producerea mutaţiilor şi recombinărilor.*

Trei studii pilot cuprinse în acest proiect au fost finalizate în 2010: Proiectul „Trio" de secvenţializare genomică cu o profunzime ridicată (20-60X) a două trio-uri (tată-mamă-copil); Proiectul de secvenţializare genomică cu o profunzime redusă (2-6X) a 179 de indivizi provenind din 3 populaţii diferite; Proiectul „Exon" de secvenţializarea a 8.140 exoni corespunzând a 906 gene selecţionate la întâmplare (şi reprezentând un total de 1,4 Mb) la 697 indivizi din 7 populaţii diferite.

Global, aceste trei proiecte pilot au permis identificarea unui număr impresionant de noi variaţii ale ADN: 8,5 milioane de noi SNP identificate, 1 milion de deleţii şi inserţii de mică talie şi 20.000 de noi variante structurale. Pe lângă variabilitatea interindividuală aceste studii au permis identificarea, la fiecare individ, a 340-400 variante ce determină pierderea funcţiei genei (apariţia de codoni stop, perturbarea siturilor de matisare sau decalarea cadrului de lectură) afectând între 250-300 gene adnotate. Astfel, se estimează că fiecare genom este heterozigot pentru 50-100 de variante clasificate de Gene Mutation Database (HGMD) ca fiind responsabile de boli genetice.

***Human Variome Project** este coordonat de Human Genome Variation Society, proiect ce continuă efortul de colectare şi indexare a mutaţiilor început de HUGO Mutation Database Initiative. Scopul acestui proiect este de a impulsiona descoperirea şi caracterizarea variaţiilor genomice patogenice, de a identifica distribuţia lor în cadrul diverselor populaţii umane şi de a descrie fenotipurile asociate. HGVS are în proiect dezvoltarea unei baze de date care să permită colectarea, documentarea şi distribuirea gratuită a informaţiilor referitoare la variaţiile genomice cu efect patogenic ale tuturor genelor.*

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

Există numeroase metode de identificare a SNPs. Cu valoare istorică se poate menționa tehnica RFLP bazată pe utilizarea enzimelor de restricție; aceasta permite însă acoperirea unei mici părți (sub 5%) din întreaga secvență a genomului uman și, de aceea, a fost necesară dezvoltarea unor tehnici noi, precum electroforeza în gel cu gradient denaturant (DGGE), analiza heteroduplexurilor, microcipuri și secvențierea.

SNP reprezintă forma cea mai frecventă a polimorfismelor ADN. În prezent, prin secvențierea genomului uman s-au identificat ~18 milioane de SNPs (~1% din genom), unul la circa 1.000 de nucleotide, dar frecvența poate fi mai înaltă în anumite regiuni precum insulele CpG – 1 la 100 sau mai redusă în interiorul unor gene – 1 la 2.500 baze).

Majoritatea SNPs (situate în regiunile intergenice, în regiunile intronice sau SNPs sinonime din regiunile codante ale genelor) sunt *neutre* și nu sunt supuse selecției naturale. Modificările regiunilor regulatoare ale genelor sau modificările nonsinonime ale regiunilor codante *pot avea efecte fenotipice* (vezi subcapitolul 6.D caseta 6.4 Factorul V Leiden) și pot fi supuse efectului selecției naturale, persistența lor în populație reflectând un avantaj selectiv și explicând o parte din diversitatea fenotipică a populațiilor umane.

> Un exemplu de polimorfisme supuse unei presiuni de selecție, importantă și recentă, sunt polimorfismele de tip SNP C/G_{-13907} (*rs41525747*), C/T_{-13910} (*rs4988235*) și T/G_{-13915} (*rs41380347*) asociate genei pentru lactază (*LCT*). Ele sunt situate într-un element activator localizat în amonte față de regiunea codantă a genei *LCT* și sunt în dezechilibru de înlănțuire cu **persistența sintezei de lactază la vârste adulte**, caracter transmis dominant (OMIM # 223100) ce permite consumul de lapte și după oprirea alimentației lactate a nou-născutului. *Alela T a SNP C/T (rs4988235), asociată cu persistența lactazei*, este caracteristică populației europene și are o prevalență semnificativ mai crescută în populațiile din Europa de Nord (70-80%) față de cele din sudul Europei (5-10%). Celelalte două polimorfisme, C/G (rs41525747) și T/G (*rs41380347*), sunt prezente în populații din Orientul Mijlociu și estul Africii.

SNP neutre constituie o sursă esențială de markeri genetici ce pot fi folosiți în identificarea genelor implicate în determinismul caracterelor poligenice, comune. Utilizarea SNP în studiile de asociere genetică la nivelul întregului genom a devenit o regulă căci marele lor dezavantaj (bialelismul) este balansat de densitatea lor importantă și de facilitatea cu care pot fi realizate genotipări folosind cip-urile SNP. Astfel, eforturi considerabile au fost realizate sau sunt în curs de efectuare pentru cartografierea și caracterizarea acestor polimorfisme (vezi caseta 7.4).

Studiul SNP este utilizat în prezent în câteva direcții majore:

- localizarea genelor de susceptibilitate pentru bolile multifactoriale bazată pe studii de dezechilibru ale înlănțuirii și studii de asociere a haplotipurilor.
- farmacogenetică, care încearcă să individualizeze tratamentul fiecărui pacient în funcție de individualitatea sa genetică; un rol major în acest domeniu îl are identificarea și înțelegerea efectelor pe care SNPs le au asupra modulării activității enzimelor implicate în metabolizarea medicamentelor;
- cercetările privind evoluția speciei umane din punct de vedere biologic (similitudinea cu alte specii) și istoric (migrația populațiilor).

2.2. *Polimorfismele fragmentelor mai mici de 1.000 perechi de baze*

În această categorie se includ *polimorfismele repetițiilor de secvențe scurte* (***SSRs***), numite inițial repetiții în tandem cu număr variabil (VNTRs) și *polimorfismele inserție-deleție* (**indels**).

a). SSR sau **VNTR** sunt reprezentate de secvențe mici, repetate în tandem, ce formează „*miniblocuri*" *dispersate* în toți cromozomii, cu o dispoziție și mărime foarte *variabilă* de la o persoană la alta; se deosebesc două familii principale: *minisateliții* și *microsateliți* (vezi subcapitolul 3.C.1.c), care împreună alcătuiesc ~3% din genom.

- **Minisateliții** sunt constituiți din repetiții în număr variabil a unei *secvențe scurte* (15-500 pb) ce formează segmente (de 1-20 kb) *dispersate* (în peste 1.000 de localizări) în toți cromozomii (excepție X și Y), ocupând anumite *situsuri precise*, inclusiv telomerele, diferite de la o persoană la alta. Unii minisateliți sunt extrem de polimorfici, putând prezenta în populația generală câteva zeci de alele, diferite prin numărul de repetiții și deci prin mărimea fragmentului de restricție în care se află minisatelitul.
- **Microsateliții** (numiți și **STRs**, de la „*short tandem repeats*") sunt formați de regulă din *repetiții foarte scurte* (1-15 nucleotide), frecvent dinucleotidice (în special CA sau TA) sau trinucleotidice, ce formează foarte numeroase segmente mai mici de 100 pb, foarte polimorfice (cu circa 10 alele diferite per locus), cu o distribuție uniformă în genom (un microsatelit la 1.000 pb). Interesant este faptul că microsateliții pot fi *instabili*: repetițiile dinucleotidice variază în diferite țesuturi la aceiași

BCU "VICTOR BABEȘ" UNIVERSITY LIBRARY

persoană, iar repetițiile trinucleotidice variază de la o generație la alta (se amplifică prin meioză).

Datorită polimorfismului foarte înalt, minisateliții și microsateliții sunt niște veritabili *markeri genetici individuali* care prin determinarea modelului dispoziției lor realizează un *profil genetic specific* ce constituie **amprenta genetică** a unui individ folosită în medicina legală pentru identificarea persoanelor sau pentru determinarea paternității.

b). Inserțiile și delețiile (indels) interesează de regulă secvențe nucleotidice foarte scurte (între 100 și 1.000 pb)[22], ce pot fi prezente sau absente, realizând un polimorfism bialelic. Indels sunt foarte numeroase. Astfel, în versiunea din octombrie 2010 a *Database of Genomic Variants*, bază de date dedicată variațiilor genomice erau catalogate 30.748 indels. Aproximativ o treime din aceste deleții/inserții au o talie cuprinsă între 200 și 400 pb și reflectă polimorfismul secvențelor *Alu* prezente în genomul uman. Polimorfismul indels este foarte util în studiul evoluției genomului uman și pentru înțelegerea structurii sale dinamice.

2.3. *Polimorfismele submicroscopice*

Polimorfismele submicroscopice (între 1.000 de nucleotide și câteva megabaze, detectabile numai prin tehnici de genetică moleculară sau de citogenetică moleculară) includ *variațiile numărului de copii, inversiile și translocațiile submicroscopice.*

a). Variațiile numărului de copii („*copy number variants*" sau **CNV**)

CNV sunt reprezentate de *segmente de ADN (≥ 1 kb) care sunt prezente într-un număr variabil de copii în comparație cu genomul de referință.* Aceste variante cantitative pot fi *câștig al numărului de copii* (duplicații, inserții) sau *pierderi* (deleții sau genotipuri *nule*). Atunci când CNV se întâlnesc la mai mult de 1% din populație se vorbește de **polimorfism al numărului de copii (CNP)**. Folosind hibridizarea genomică comparativă (CGH) pe microrețele ADN, s-a stabilit că CNV sunt foarte numeroase, aproximativ 57.829 fiind deja catalogate în versiunea din octombrie 2010 a *Database of Genomic Variants.* Dintre acestea, cele mai numeroase sunt cele cu o mărime cuprinsă între 1-10 kb și 10-50 kb (reprezintă împreună mai mult de 80% din totalul CNV. Însumate, aceste variații afectează până la 900 Mb (echivalentul a aproximativ 33% din genomul uman), cu mult mai mult decât totalitatea nucleotidelor reprezentate de SNP identificate.

Trei mecanisme principale sunt implicate în apariția CNV: recombinarea omoloagă nonalelică, recombinarea non-omoloagă și colapsul furcii de replicare a ADN cu schimbarea matriței ADN (FoSTeS – *FOrk Stalling and TEmplate Switching*), mecanism favorizat de prezența de micro-omologii între diferite regiuni ale ADN.

CNV reprezintă *sursa principală de variație genetică printre indivizii umani*[23]. CNVs pot fi variante polimorfice *benigne* sau pot produce fenotipuri anormale, prin alterarea dozajului genic sau modificarea structurii genice. Cert este că CNVs au avut un rol important în evoluția genelor, genomului și populațiilor umane.

Majoritatea acestor variații sunt localizate în afara regiunilor codante, sunt *neutre* și se transmit de-a lungul generațiilor. Unele variații interesează însă regiuni codante și sunt supuse fie unei selecții negative (selecție purificatoare), fie unei selecții pozitive, ca în cazul genei *AMY.*

Această genă codifică amilaza salivară, enzimă implicată în degradarea amidonului, și este localizată într-o regiune genomică ce prezintă un polimorfism important între populații diferite. Numărul mediu de copii al genei *AMY* este mai mare în populațiile ce au o alimentație bogată în amidon (populații sedentare de cultivatori) față de populațiile cu o alimentație redusă în amidon (populații de culegători din pădurea ecuatorială sau vânători-pescari din regiunea Cercului Polar).

Alte variații sunt localizate în regiuni conținând:

- gene implicate în metabolismul medicamentelor sau al unor substanțe toxice exogene (*CYP2D6* și *GSTM1* ce codifică o proteină aparținând familiei citocromilor P450 și respective o enzimă cu rol de glutation-S-tranferază);
- gene ce participă în apariția unor boli multifactoriale (de exemplu, un număr ridicat de copii a genei pentru β-defensină localizată în regiunea cromozomială 8p23.1 este asociat cu un risc crescut de apariție al psoriazisului);
- gene implicate în sensibilitatea la unele infecții (un număr ridicat de copii al genei *CCL3L1*, genă localizată în 17q12 și care codifică o chemokină, are efect protectiv contra infecției cu virusul HIV).

b). Polimorfismul inversiilor sau translocațiilor

Segmente mari de ADN pot avea orientare diferită la persoane diferite sau, în cazul unor translocații, o poziție diferită; aceste variante sunt mult mai puțin numeroase decât variațiile numărului de copii. Ele sunt favorizate de prezența de regiuni cu similitudine

22. Indels pot interesa și un singur nucleotid.
23. Se apreciază că fiecare persoană are 10-12 variante mari de tipul CNV.

BCU "CAROL DAVILA" UNIVERSITY LIBRARY

crescută de secvență, în general de peste 95% (LCR, duplicații segmentare) (vezi capitol 3.C.3).

Un exemplu de polimorfism frecvent este inversia unui segment de 900 kb situat pe 17q21.31. Această inversie, definită ca *haplotipul H2*, este prezentă în stare heterozigotă la aproximativ 20% din indivizii de origine europeană, dar practic absentă în alte populații. Haplotipul H2 predispune la recombinare omoloagă nealelică și la apariția sindromului microdeleției 17q21.31 cu un fenotip specific (OMIM * 610443): întârziere mentală, dismorfie facială, hipotonie și anomalii cerebrale structurale

O altă categorie de polimorfisme este constituită de **translocațiile submicroscopice subtelomerice**. Regiunile subtelomerice sunt constituite din secvențe repetitive specifice unui cromozom sau comune mai multor cromozomi. Această caracteristică explică posibilitatea producerii de translocații subtelomerice sau ale unor deleții și duplicații neechilibrate. Diagnosticul dezechilibrelor subtelomerice, responsabile de retard mental asociat cu o dismorfie mai mult sau mai puțin importantă, este realizat prin folosirea de sonde FISH specifice fiecărei regiuni subtelomerice. Identificarea unui dezechilibru subtelomeric la un pacient necesită realizarea unei anchete familiale, anchetă ce poate releva prezența, la unul din părinți, a unei translocațiile submicroscopice subtelomerice echilibrate.

c). Polimorfismele genelor ARN necodant

La tipurile de polimorfisme ADN descrise mai sus s-au adăugat recent *polimorfismele genelor ARN necodant*. Au descrise *polimorfisme ale micro ARN* **(RNAPmi)** – ce interesează genele ce codifică moleculele reglatoare de ARNmi (influențând biogeneza lor) sau situsurile de fixarea ale ARNmi (din regiunea 3'UTR a genei) precum și *polimorfisme ale ARN necodant lung* – care afectează numeroase gene de ARNnc.

Există deja argumente că mutațiile sau polimorfismele ARNnc (care controlează expresia genelor pentru proteine) sunt implicate în etiopatogenia anomaliilor congenitale și ale diferitelor boli comune (cardiovasculare, neurodegenerative, cancer); efectele sunt însă mult mai subtile (fenotipuri „mai blânde" decât cele produse de mutația genelor pentru proteine) și deci mai greu de identificat. A fost descrisă implicarea ARNnc în diferite boli: cancer (ARNmi; ARN linc), sindromul Prader-Willi (deleția ARNsno SNORD116), autism (duplicația ARNsn SNORD115), boala Alzheimer (ARNnc lung antisens: – BACE1-AS).

Capacitatea ARNnc lung de a regla genele ce codifică proteine se poate corela cu patogenia unor boli prin *expresia anormală acestui tip de ARNnc* care va deregla funcția genelor pentru proteinele pe care le reglează. Dacă se vor putea identifica modificările reglatorii produse de ARNnc care stau la baza unor boli comune atunci există premiza optimistă a reversiei lor și posibilitatea (acum teoretică) că *bolnavii vor putea fi tratați cu medicamente ce fac o anumită genă mai mult sau mai puțin activă.*

2.4. Polimorfismele microscopice

Polimorfismele microscopice cuprind **heteromorfismele cromozomiale**, numite și variante cromozomiale, și sunt reprezentate de modificările citogenetice ale aspectului unuia din cromozomii omologi, modificări ce nu sunt asociate cu un fenotip anormal. Heteromorfismele cromozomiale cuprind heteromorfismele heterocromatinei, heteromorfismele eucromatinei și situsurile fragile, unele *inversii* și unii *cromozomi marker*.

Heteromorfismele heterocromatinei sunt variații de mărime și poziție a heterocromatinei constitutive, variații ce pot fi observate prin anumite tehnici de marcaj în benzi C.

- Variații în mărimea *heterocromatinei pericentromerice*, în special la nivelul cromozomilor acrocentrici;
- Variații în morfologia *brațelor scurte ale cromozomilor acrocentrici* satelizați, interesând fie sateliții (cromozomii putându-i pierde sau, dimpotrivă, putând avea 1-2 sateliți suplimentari), fie regiunea filament (evidențiată prin marcajul NOR) ce conține gene pentru ARN ribozomal (vezi figura 2.18).
- Variațiile de mărime și/sau de poziție ale regiunilor cu heterocromatină constitutivă situate pe brațele lungi ale cromozomilor 1, 9, 16 și Y. Variațiile de mărime sunt notate, conform convenției ISCN, ca 1qh+, 9qh+, 16qh+ și Yqh+. Variațiile de poziție includ inversiile pericentrice ale heterocromatinei constitutive ai cromozomilor 1, 9 și 16. Aceste regiuni sunt constituite din secvențe repetitive, iar mecanismul de formare a acestor variante este cel de recombinare omoloagă nonalelică.
- Translocația regiunilor heterocromatinice. În numeroase cazuri a fost descrisă translocația regiunii NOR pe alți cromozomi (1, 2, 4, 7, 10, 12, 17, X) sau, mai rar, translocații ale heterocromatinei brațului lung al cromozomului Y pe brațele scurte ale unor cromozomi acrocentrici (15, 22) și chiar inserția acestei regiuni pe cromozomul 11.

Heteromorfismele eucromatinei, numite și variante eucromatinice, sunt reprezentate fie de prezența unor benzi suplimentare în anumite regiuni cromozomiale, fie de deleția sau duplicația unor benzi prezente în mod normal. Variante eucromatinice determinate de prezența benzilor suplimentare au fost

descrise în regiunile cromozomiale 8p23.1, 9p12, 9q12, 9q13, 15q11.2 şi 16p11.2. Aceste variante rezultă din duplicaţii/amplificări ale unor regiuni ce conţin fie secvenţe repetitive, fie grupuri de gene aparţinând aceleiaşi familii (defensine şi receptori olfactivi în cazul regiunii 8p23.1). În alte situaţii, deleţii ale unor regiuni cromozomiale (2p11.2-p12, 2q13-q14.1, 9p21.2-22.1, 11p12) sau duplicaţii (1p21-31, 2q28-29, 10p13p13) au fost evidenţiate la persoane cu fenotip normal.

Situsurile fragile (FRA) sunt definite ca regiuni cromozomiale predispuse la apariţia de lacune sau rupturi sub influenţa condiţiilor de cultură celulară. Situsurile fragile sunt clasificate în funcţie de frecvenţa în populaţie şi de condiţiile de cultură necesare punerii lor în evidenţă.

- În funcţie de frecvenţă ele se împart în situsuri fragile rare, cu frecvenţă intermediară şi frecvente. *Situsuri fragile rare* au o frecvenţă până la 1% şi adesea sunt polimorfisme private, specifice unei familii. *Situsurile fragile cu frecvenţă intermediară* sunt identificate între 1% şi 5% din indivizi. *Situsurile fragile comune* (FRA3B localizat în regiunea 3p14.2, FRA6E în 6q26, FRA7H în 7q32.3, FRA16D în 16q23 şi FRAXB în Xp22.3, spre exemplu) fac parte din arhitectura normală a cromozomilor şi sunt evidenţiabile în principiu la toţi indivizii. Totuşi numărul de celule în care acestea sunt evidenţiate variază de la 0% la 20%, în funcţie de condiţiile de cultură.
- În funcţie de condiţiile de cultură, situsurile fragile sunt clasificate în situsuri induse de deficienţa în folat, sau de tratamentul culturii cu distamicină A, aphidicolină sau bromodeoxiuridină (BrdU).

Unele **inversiile pericentrice** implicând fie regiuni eucromatinice – inv(2)(p11.2q13), inv(10)(p11.2q21.2) –, fie regiuni heterocromatinice ale braţelor lungi ale cromozomilor 1 şi 9 – inv(1)(p11q12) şi inv(9)(p11q12) – sunt considerate ca heteromorfisme cromozomiale, deci fără efect fenotipic. În această categorie pot fi incluşi şi **cromozomii marker** cu conţinut exclusiv heterocromatinic şi care, nefiind supuşi unei presiuni de selecţie se pot transmite de-a lungul generaţiilor, constituind adesea o „surpriză" la efectuarea cariotipului.

2.5. *Aplicaţiile practice ale polimorfismelor ADN*

Polimorfismele genetice sunt amplu folosite în toate cercetările de genetică medicală deoarece permit diferenţierea diferitelor alele ale unei gene sau ale diferitelor segmente de ADN genomic. Calitatea de *markeri genetici* a fost utilizată pentru cartografierea

CASETA 7.5

Prima utilizare a amprentei ADN în investigaţia criminalistică

În 1983, în apropierea unui sat din centrul Angliei, numit Narborough, pe o cărăruie ce trecea în apropierea unui spital psihiatric a fost bătută, violată şi strangulată Lynda M., de 15 ani. Poliţia a găsit puţine indicii asupra criminalului, iar testele criminalistice convenţionale, efectuate pe sperma recoltată de la victimă, au stabilit o combinaţie fenotipică prezentă la 10% din populaţie. În ciuda unor ample investigaţii cazul nu a putut fi rezolvat.

Trei ani mai târziu, o altă fată (Dawn A.) a fost agresată sexual şi ucisă la câteva sute de metri de locul primei crime. De data aceasta a fost arestat Richard B., de 17 ani, care era uşor retardat mental şi lucra ca bucătar în spitalul de psihiatrie; el cunoscuse fata şi avea tulburări de comportament, inclusiv sexual. După interogatorii dure el şi-a mărturisit fapta.

A fost redeschis primul caz şi probele de spermă recoltate de la cele două fete omorâte, precum şi o probă de sânge de la Richard au fost trimise Profesorului Alec Jeffreys, de la Universitatea din Leicester. Jeffrey folosise deja studiul VNTR (minisateliţi) într-o dispută legată de imigrare. De data aceasta, profesorul Jeffrey a folosit o sondă multilocus şi a stabilit „profilul ADN" la cele trei probe; concluziile au fost oarecum surprinzătoare: cele două fete au fost agresate sexual de acelaşi bărbat dar acesta nu era Richard B.

Poliţia a perseverat în rezolvarea celor două cazuri solicitând bărbaţilor şi adolescenţilor din satul Narborough şi împrejurimi să accepte voluntar testul ADN pe o probă de sânge. După câteva mii de probe, ce reprezentau 98% din bărbaţii din zonă nu s-a obţinut nici un indiciu. Ca de obicei a intervenit şansa: într-un pub din Narborough cineva a povestit, după câteva halbe de bere, că a acceptat să i se ia o probă de sânge pentru altcineva, Colin P., (28 de ani) un cunoscut brutar şi cofetar, care evident nu dăduse o probă de sânge. Colin P. a fost arestat şi ADN său (a 4583-a probă analizată de profesorul Jeffrey) se potrivea perfect cu profilul ADN al probelor de spermă recoltate de la victime (text adaptat după Mange et al., *1999).*

genică prin analize de înlănțuire, diagnosticul prenatal sau presimptomatic al unor boli genetice, depistarea heterozigoților purtători de gene recesive, identificarea persoanelor cu risc crescut sau scăzut pentru anumite boli comune ale adultului, tiparea tisulară pentru transplante de organe, teste de paternitate și identificarea persoanelor (prin amprente genetice; vezi caseta 3.4 și caseta 7.5).

Identificarea *diferențelor genetice* dintre persoane și corelarea variațiilor specifice sau ale combinațiilor lor cu riscul diferit la boli comune (vezi capitolul 13) sau cu eficacitatea unor tratamente (farmacogenomică) reprezintă bazele genomice ale **medicinii personalizate** (vezi capitolul 9.D).

Bibliografie specifică selectivă

1. Avent ND, Reid ME. *The Rh blood group system*. Blood 2000; 95:375-387.
2. Bishop AJR, Schiestl RH. *Homologous recombination as a mechanism for genome rearrangements: environmental and genetic effects*. Hum Mol Genet 2000; 9:2427-2434.
3. Cotton RGH, Horaitis O. *Human Genome Variation Society*. În *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, 2005.
4. Fregonese L, Stolk J. *Herediary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequence*. Orphanet J Rare Dis 2008; 3:16doi:10.1186/1750-1752-3-16.
5. Gu W, Zhang F, Lupski JR. *Mechanisms for human genomic rearrangements*. PathoGenetics 2008, 1:4 doi:10.1186/1755-8417-1-4.
6. Harfe BD, Jinks-Robertson S. *DNA mismatch repair and genetic instability*. Ann Rev Genet 2000; 34:359-399.
7. Inoue K, Lupski JR. *Molecular mechanisms for genomic disorders*. Annual Rev Genomics Hum Genet 2002; 3:199-242.
8. Jeffrey AJ. *DNA typing: approaches and applications*. J Foresnic Sci Soc 1993; 33:204-211.
9. Knight JC. *Human Genetic Diversity: Functional Consequences for Health and Disease*. Oxford University Press, 2009.
10. La Spada AR, Taylor JP. *Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis*. Nature Review Genetics 2010; 11:247-258.
11. Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. *Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders*. Nat Genet 2007; 39:S48-54.
12. Lupski JR, Stankiewicz P. *Genomic Disorders: Molecular Mechanisms for rearrangements and Conveyed Phenotypes*. PLoS Genetics 2005; 1:e49.
13. Mani RS, Chinnaiguan AM. *Triggers for genomic rearrangement; insight into genomic, cellular and environmental influences*. Nature Review Genetics 2010; AOP, publicat online 2 noiembrie 2010; doi:10.1038/nrg2883.
14. McMurray CT. *Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development*. Nature Review Genetics 2010; 11:786-799.
15. Ng PC, Levy S, Huang J, Stockwell TB, Walenz BP *et al. Genetic Variation in an Individual Human Exome*. PLoS Genet 2008, 4(8):e1000160.
16. Peltomaki P. *Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer*. Hum Mol Genet 2001; 10:735-740.
17. Petronczki M, Simos MF, Nasmyth K. *Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis*. Cell 2003; 112:423-440.
18. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. *ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009): Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*. Ed. S. Karger AG, 2009.
19. Sharp AJ, Cheng Ze, Eichler EE. *Structural Variation of the Human Genome*. Annual Rev Genomics Hum Genet 2006; 7:407-442.
20. Shastry BS. *SNP alleles in human disease and evolution*. J Hum Genet 2002; 47:561-566.
21. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Howells K *et al. The Human Gene Mutation Database: 2008 update*. Genome Medicine 2009, 1:13 (doi:10.1186/gm13).
22. The 1000 Genomes Project Consortium*. A *map of human genome variation from population-scale sequencing*. Nature 2010, 467:1061-1073.
23. Thompson SL, Bakhoum SF, Compton DA. *Mechanisms of chromosomal instability*. Current Biology 2010; 20:R285-295.
24. Vanneste E, Voet T, Le Caignec C *et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos*. Nature Medicine 2009; 15:577-583.
25. Via M, Gignoux C, Burchard EG. *The 1000 Genomes Project: new opportunities for research and social challenges*. Genome Medicine 2010; 2:3.
26. Yip SP. *Sequence variation at the human ABO locus*. Ann Hum Genet 2002; 66:1-27.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

27. Youssoufian H, Pyeritz RE. *Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans*. Nat Rev Genet 2002; 3:748-758.
28. Zhang F, Carvalho C, Lupski JR. *Complex human chromosomal and genomic rearrangements.* Trends in Genetics 2009; 25:298-307.
29. Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. *Copy Number Variation in Human Health, Disease, and Evolution.* Annual Rev Genomics Hum Genet 2009; 10:451-481.
30. Zhou BBS, Elledge SJ. *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. Nature 2000; 408:433-439.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 8

GENETICA POPULAȚIILOR

Genetica medicală se preocupă nu numai de stabilirea unui diagnostic corect al bolii unui pacient, dar şi de evaluarea riscului de recurenţă a afecţiunii la rudele sale. În această acţiune, specifică geneticii medicale, trebuie luate în considerare atât *frecvenţa genelor* mutante, cât şi genotipurile persoanelor din populaţia generală care se pot căsători cu membrii familiei bolnavului. Prin urmare, în genetica medicală, *la evaluarea unui pacient se va ţine cont atât de familia sa, cât şi de populaţia căreia îi aparţine.*

Unul dintre obiectivele fundamentale ale geneticii medicale este determinarea cât mai exactă a riscului de recurenţă al bolii genetice a probandului la rudele sale. Realizarea acestui obiectiv, specific geneticii medicale, reclamă cunoaşterea atât a *frecvenţei genelor mutante, cât şi a genotipurilor* persoanelor din populaţia generală care stabilesc, cu membrii familiei bolnavului, relaţii de cuplu în vederea reproducerii. Rezultă, aşadar, că evaluarea riscului de recurenţă precum şi acordarea ulterioară a sfatului genetic sunt condiţionate de datele privitoare nu numai la familia pacientului, ci şi la populaţia căreia acesta îi aparţine

A. Frecvenţa genelor şi genotipurilor într-o populaţie

1. Definiţia şi obiectivele geneticii populaţiilor

Populaţia poate fi definită ca fiind *o comunitate* de indivizi aparţinând aceleiaşi specii, care au *o constelaţie comună de gene*, ocupă un anumit teritoriu şi prezintă anumite particularităţi fenotipice şi genotipice. Coexistând în acelaşi areal, membrii comunităţii sunt relativ izolaţi reproductiv faţă de alte populaţii, uniunile realizându-se la întâmplare (în *panmixie*), dar prevalent în cadrul grupului, ceea ce limitează imixtiunile genotipice în populaţia respectivă.

Fiecare organism moşteneşte de la părinţii săi, prin genele gameţilor, informaţiile necesare pentru formarea şi dezvoltarea sa. În acest mod, membrii unei populaţii umane primesc şi transmit gene asemănătoare. Totalitatea genelor existente la un moment dat în populaţie alcătuiesc **fondul comun de gene** sau **genofondul** („*gene pool*", în limba engleză). Indivizii reprezintă „*asocieri temporare şi specifice (unice) ale unor gene*" din constelaţia de gene caracteristică populaţiei. Din acest punct de vedere, populaţia biologică este mai curând „*o populaţie de gene*" decât un grup de indivizi; populaţiile pot fi deci descrise în termeni de frecvenţă a diferitelor alele şi genotipuri, care determină anumite fenotipuri.

> De exemplu, în populaţia britanică, frecvenţa relativă a genotipurilor sistemului de grup sangvin MN este următoarea: *M/M* – 28%, *N/N* – 22% şi *M/N* – 50%.

Grupele şi subgrupele populaţionale se deosebesc unele de altele prin constelaţia specifică (fondul) de gene, determinată de frecvenţele diferite ale alelelor unor loci multipli.

> Dintre numeroasele exemple cunoscute vom menţiona doar câteva:
>
> - în sistemul polialelic al grupului sangvin AB0, alela B predomină în populaţia asiatică şi frecvenţa ei se reduce de la est spre vest; alela A predomină în vestul Europei, iar alela 0 în populaţia africană;
> - sicklemia este frecventă în Africa, fibroza chistică predomină în populaţia albă din Europa şi SUA, deficienţa în aldehid dehidrogenază 1 este comună în populaţia asiatică; boala Tay-Sachs are o frecvenţă ridicată la grupurile de evrei aşkenazi; coroideremia este comună în Finlanda; distrofia miotonică în Québec etc.

În populaţie, genele formează numeroase combinaţii ce interacţionează şi se influenţează reciproc.

ROMANIAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Între gene se stabilesc *relaţii alelice şi nonalelice* ce fac ca ansamblul lor să fie integrat. Acest fapt conferă constelaţiei genice a populaţiei *o puternică coeziune*. Împerecherea întâmplătoare (panmictică) a membrilor populaţiei produce un schimb permanent de gene, care, printr-o continuă recombinare şi segregare meiotică, generează la descendenţi o heterozigoţie perpetuă şi masivă. Această mare bogăţie genotipică determină în populaţie *o intensă variabilitate genetică*. Ea explică unicitatea genetică a fiecărei persoane şi, implicit, vigoarea, adaptabilitatea şi vitalitatea populaţiei. Exceptând parţial omul, la celelalte specii individul are un rol neînsemnat în evoluţie; rolul decisiv revine populaţiei, aceasta reprezentând unitatea majoră a evoluţiei. *Populaţia biologică este deci o populaţie de gene, o unitate de reproducere panmictică şi o unitate de evoluţie.*

Genetica populaţiilor umane studiază frecvenţa genelor şi proporţiile relative ale diferitelor genotipuri în interiorul unei populaţii, precum şi factorii care menţin sau modifică frecvenţa lor de la o generaţie la alta. Evaluarea acestor parametri este necesară pentru:

- *definirea structurii genetice* caracteristice populaţiei respective, prin frecvenţa specifică a unor gene mutante şi boli genetice; existenţa unor alele mutante specifice unei populaţii are importanţă pentru înţelegerea originii bolilor genetice şi furnizează informaţii utile pentru diagnosticul bolii în populaţiile cu risc crescut;
- *sfatul genetic*, prin cunoaşterea frecvenţei diferitelor genotipuri în populaţie; de exemplu, evaluarea incidenţei heterozigoţilor sănătoşi purtători ai unei gene recesive (Na) şi calcularea riscului de apariţie în descendenţă a unor copii afectaţi (aa);
- aprecierea *necesităţilor medico-socio-economice*, prin evaluarea frecvenţei genotipurilor anormale în populaţie; de exemplu, evaluarea rentabilităţii programelor de depistare genetică într-o anumită populaţie.

Genetica populaţiilor are multe elemente comune cu epidemiologia ce studiază interrelaţiile dintre factorii genetici şi de mediu, determinante ale frecvenţei şi distribuţiei bolilor în colectivităţile umane. Cele două domenii formează împreună **epidemiologia genetică**, care se ocupă îndeosebi de bolile multifactoriale, frecvente în viaţa adultului.

2. Echilibrul genetic. Legea Hardy-Weinberg

Un obiectiv major al geneticii populaţiilor este acela de a evalua frecvenţa alelelor şi a genotipurilor într-o generaţie filială, când această frecvenţă este cunoscută în generaţia parentală. Predicţia se bazează pe legile eredităţii şi se realizează utilizând metodele matematice ale statisticii şi teoriei probabilităţii.

Datorită raporturilor de dominanţă şi recesivitate care se stabilesc între alele, ar fi de aşteptat ca frecvenţa fenotipurilor dominante să fie mai mare şi să crească pe seama celor recesive. Astfel, în medie, 3/4 din descendenţii a doi heterozigoţi (An+An) ar manifesta caracterul dominant şi numai 1/4 ar avea caracterul recesiv. În realitate, în populaţiile mari şi panmictice (în care împerecherea se face la întâmplare[1]), aceste fenomene nu se observă şi populaţia este în **stare de echilibru**, *proporţia relativă a diferitelor genotipuri rămânând constantă (stabilă) de la o generaţie la alta.* Această observaţie este demonstrată prin legea stabilită în anul 1908 de către medicul german Wilhelm Weinberg şi de matematicianul englez Godfrey H. Hardy, care postulează următorul principiu:

> *într-o populaţie panmictică, atât frecvenţa alelelor cât şi frecvenţa genotipurilor rămân constante de la o generaţie la alta, în absenţa mutaţiei, migraţiei şi selecţiei naturale. Echilibrul este atins după o singură generaţie de împerechere întâmplătoare, indiferent de compoziţia iniţială a populaţiei.*

Pentru a demonstra legea Hardy şi Weinberg presupunem că un anumit locus autozomal are două alele **A** şi **a**. Dacă notăm cu *„p"* frecvenţa alelei **A** şi cu *„q"* frecvenţa alelei **a** atunci suma totală a alelelor acestui locus într-o populaţie dată este $p + q = 100\%$. Deoarece frecvenţele alelice sunt exprimate de obicei ca o fracţie a unităţii, relaţia se poate scrie şi $p + q = 1$.

Cele două alele **A** şi **a** pot alcătui, prin combinarea lor aleatorie, trei genotipuri diferite: *AA, Aa* şi *aa*. Indivizii din populaţie posedă doar unul din aceste genotipuri. Ei vor produce, prin meioză, gameţi ce conţin fie alela **A**, fie alela **a**. Gameţii purtători ai acestor alele vor fi în aceeaşi proporţie, respectiv p şi q, ca şi frecvenţele alelice în populaţie. Prin împerecherea aleatorie (independentă de genotip şi de fenotip) a indivizilor şi deci a gameţilor masculini şi feminini, ce conţin fie alela **A**, fie alela **a** (cu frecvenţele p şi q) rezultă în descendenţă (F_1) indivizi cu unul din următoarele trei genotipuri posibile: *AA, Aa, aa* (tabelul 8.1). Frecvenţele acestor genotipuri vor fi p^2, $2pq$ şi q^2, fiind o extensie a binomului $(p+q)^2$, iar suma frecvenţelor lor egală cu 1. O populaţie în care distribuţia genotipurilor este binomială se află în *echilibru genetic*.

În generaţia următoare, fiecare din cele trei genotipuri paterne se poate asocia cu oricare din cele trei genotipuri materne (tabelul 8.2). Genotipurile ce rezultă la descendenţi din fiecare uniune precum şi frecvenţa lor este prezentată în tabelul 8.3 Din aceste

1. Fiecare individ are aceeaşi oportunitate de împerechere cu oricare individ de sex opus din populaţie, fără a fi supus mutaţiei sau selecţiei.

BUASVM CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Tabel 8.1. Frecvența genotipurilor realizată de alelele *A* și *a* ale unui locus autozomal dat

		Gameți masculini	
		A (*p*)	*a* (*q*)
Gameți feminini	*A* (*p*)	*AA* (p^2)	*Aa* (*pq*)
	a (*q*)	*Aa* (*pq*)	*aa* (q^2)
Frecvența totală a genotipurilor la descendenți = $p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1$			

Tabel 8.2. Frecvența diferitelor încrucișări parentale

		Genotipuri paterne		
		AA (p^2)	*Aa* (*2pq*)	*aa* (q^2)
Genotipuri materne	*AA* (p^2)	*AA* × *AA* (p^4)	*AA* × *Aa* ($2p^3q$)	*AA* × *aa* (p^2q^2)
	Aa (*2pq*)	*Aa* × *AA* ($2p^3q$)	*Aa* × *Aa* ($4p^2q^2$)	*Aa* × *aa* ($2pq^3$)
	aa (q^2)	*aa* × *AA* (p^2q^2)	*aa* × *Aa* ($2pq^3$)	*aa* × *aa* (q^4)

încrucișări rezultă descendenți cu genotipurile *AA*, *Aa* și *aa*. Frecvențele lor (calculate pe baza datelor din tabelul 8.3) sunt p^2, $2pq$ și q^2.

Se observă că frecvența fiecărui genotip (*AA*, *Aa*, *aa*) în generația a doua (F_2) este aceeași (p^2, $2pq$, q^2) ca și în prima generație; la fel se întâmplă și cu frecvențele alelelor, deoarece $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, deci $(p + q)^2 = 1$ sau $p + q = 1$.

O populație care demonstrează relațiile/caracteristicile de bază ale legii Hardy-Weinberg este considerată a fi în echilibru Hardy-Weinberg. Acest echilibru a fost clar demonstrat mai sus pentru un locus autozomal bialelic. Pentru un locus legat de cromozomul X situația este puțin diferită în sensul că echilibrul nu se realizează după prima generație de încrucișări întâmplătoare; el este obținut într-o manieră oscilatorie, după un număr de generații, întrucât transmiterea ereditară diferă la bărbați și femei (bărbații moștenesc unicul cromozom X de la mamele lor și îl transmit fiicelor; cromozomii XX de la femei provin însă de la ambii părinți). Când se realizează echilibrul alelic, el este menținut în generațiile următoare. În aceste condiții, frecvența genică este aceeași la ambele sexe, frecvența bărbaților afectați (hemizigoți X^aY) este egală cu aceea a genei alele mutante (X^a) în timp ce frecvențele genotipice la femei (XX) sunt la fel ca și în cazul unui locus autozomal.

Din demonstrația și enunțul legii se remarcă faptul că Hardy și Weinberg au explicat bazele frecvenței constante a genelor ca o aplicație a distribuției binomiale (descoperită de sir Isaac Newton și fundamentată de Bernoulli). Conform distribuției binomiale, când există două eventualități alternative, una cu probabilitatea **p** și cealaltă cu probabilitatea **1 – p = q**, frecvențele combinațiilor posibile ale lui **p** și **q** într-o serie de **n** probe, este dată de expansiunea $(p + q)^n$. În cazul nostru, *p* și *q* sunt probabilitățile de producere a două evenimente alternative, cele două alele ale locusului, iar *n* este numărul alelelor pentru un locus dat.

Legea Hardy-Weinberg este valabilă numai în anumite condiții:

- populațiile sunt mari;
- încrucișările au loc la întâmplare și nu există căsătorii preferențiale sau consangvine;
- nu se produc mutații ale locusului analizat sau rata mutațiilor este constantă (alelele mutante pierdute prin deces sunt înlocuite prin mutații noi);

Tabelul 8.3. Frecvența diferitelor genotipuri la descendenți

Încrucișări parentale		Descendenți		
Tipuri	*Frecvență*	*AA*	*Aa*	*aa*
AA x AA	p^4	p^4	-	-
AA x Aa	$4p^3q$	$2p^3q$	$2p^3q$	-
AA x aa	$2p^2q^2$	-	$2p^2q^2$	-
Aa x Aa	$4p^2q^2$	p^2q^2	$2p^2q^2$	p^2q^2
Aa x aa	$4pq^3$	-	$2pq^3$	$2pq^3$
aa x aa	q^4	-	-	q^4
Total descendenți		$AA = p^4 + 2p^3q + p^2q^2 = p^2(p^2 + 2pq + q^2) = p^2(p + q)^2 = p^2(1)^2 = p^2$	$Aa = 2p^3q + 2p^2q^2 + 2p^2q^2 + 2pq^3 = 2pq\,(p^2 + 2pq + q^2) = 2pq\,(p+q)^2 = 2pq(1)^2 = 2pq$	$aa = p^2q^2 + 2pq^3 + q^4 = q^2(p^2 + 2pq + q^2) = q^2(p + q)^2 = q^2(1)^2 = q^2$

BCU IAȘI / CENTRUL UNIVERSITAR

- nu există selecție față de un anumit fenotip; toate genotipurile unui locus având o viabilitate și o fertilitate egale;
- nu se produc migrații care să modifice structura genetică a populației.

Așa cum se va vedea, aceste condiții nu sunt totdeauna îndeplinite în toate populațiile umane, dar amploarea factorilor ce intervin este limitată, modificările frecvenței alelelor fiind echilibrate fie la nivelul inițial, fie la un nou nivel. Astfel legea Hardy-Weinberg rămâne relativ valabilă și poate fi aplicată în practica geneticii medicale, pentru a estima frecvențele alelice.

3. Aplicațiile medicale ale legii Hardy-Weinberg

3.1. Obținerea unor date despre frecvența genică utile pentru realizarea sfatului genetic

În elaborarea sfatului genetic și implicit pentru calcularea riscului genetic este utilă cunoașterea genotipului unei persoane, care poate fi dedusă sau calculată în funcție de datele sale familiale și, în special, de gradul de rudenie cu un bolnav cu o afecțiune genetică, precum și frecvența genotipurilor corespunzătoare în populația din care provine partenerul de cuplu al persoanei respective, calculate conform legii Hardy-Weinberg.

a) Boli autozomal dominante

În afecțiunile autozomal dominante, în care bolnavii pot fi homozigoți (*AA*) și heterozigoți (*An*), frecvența homozigoților (q^2) este foarte mică comparativ cu frecvența heterozigoților afectați (*2pq*). În aceste condiții, frecvența (q) a alelei mutante dominante (*A*) este extrem de mică față de frecvența (p) a alelei normale (*n*). De exemplu, în *hipercolesterolemia familială*, frecvența bolnavilor homozigoți (q^2) este 1:1.000.000, iar a celor heterozigoți (*2pq*) este 1:500. Frecvența (q) a alelei mutante este 1:1.000 sau 0,001, iar frecvența (p) a alelei normale este $p = 1 - q = 0,999$, deci aproximativ egală cu 1.

Pentru practica medicală se poate conchide că aproape orice pacient cu o boală autozomal dominantă este heterozigot (bolnavii homozigoți sunt atât de rari încât pot fi excluși din calcul) și deci *frecvența bolii este aproximativ egală cu frecvența heterozigoților*. În acest caz, frecvența alelei mutante dominante este jumătate din frecvența bolnavilor heterozigoți (*2pq* sau *2q*, deoarece $p \approx 1$).

b) Boli autozomal recesive

Cunoscând frecvența (q^2) a bolnavilor (*aa*), se pot calcula: frecvența (q) a alelei mutante recesive (q = radical din frecvența bolnavilor), frecvența (p) a alelei normale și frecvența heterozigoților (*2pq*). De exemplu, frecvența bolnavilor (q^2) cu fibroză chistică (*mucoviscidoză*) în Europa este de circa 1:2.500; rezultă că frecvența (q) a alelei mutante recesive (*a*) este q = radical din 1:2500 = 1:50 = 0,02. Frecvența alelei normale (*N*) este $p = 1 - q = 1 - 1:50 = 49:50 = 0,98$. Frecvența heterozigoților (*2pq*) este egală cu $2 \times 49:50 \times 1:50 = 1:25$ deci 4% din populație. Acest lucru are o importanță deosebită pentru sfatul genetic acordat persoanelor din familia unui bolnav cu fibroză chistică.

Pentru afecțiunile autozomal recesive rare ($q^2 >$ 1:10.000) frecvența alelei normale este $p \approx 1$, iar frecvența heterozigoților este aproximativ egală cu *2q*, deci de două ori frecvența genei mutante. De exemplu, în cazul *fenilcetonuriei*, frecvența bolnavilor este de 1:10.000, iar frecvența heterozigoților este 2 × (radical din 1:10.000) = 2 × 1:100 = 1:50 sau 2%.

Din ambele exemple prezentate mai sus se poate remarca faptul că, *deși bolnavii homozigoți sunt rari, heterozigoții sunt numeroși*. Deoarece numărul bolilor recesive este mare (circa 4.000), foarte probabil că toți oamenii poartă, în stare heterozigotă, câteva alele anormale; totuși, probabilitatea ca aceste alele recesive să ajungă împreună la homozigoți este redusă (exceptând căsătoriile consangvine).

c) Boli legate de X

Aprecierea frecvenței alelice pentru genele situate pe cromozomul X diferă de modul determinării frecvențelor alelice pentru gene autozomale, deoarece în cazul bolilor legate de X bărbații (XY) sunt hemizigoți.

Pentru bolile recesive, bărbații pot avea numai două genotipuri posibile – X^NY și X^aY –, spre deosebire de femei (XX), care pot avea trei genotipuri X^NX^N, X^NX^a și X^aX^a. Frecvența (q) a alelei mutante recesive (*a*) situate pe X este egală cu frecvența bolii la bărbați; frecvența (p) a alelei normale (*N*) este mult mai mare decât q, iar pentru afecțiunile foarte rare (q – foarte mic) p va fi aproape egal cu 1. Incidența celor două alele *N* și *a* este aceeași la ambele sexe. De aici rezultă că *frecvența afecțiunilor recesive legate de X este mai mare la bărbați* (q) decât la femei (q^2), iar frecvența femeilor heterozigote (X^NX^a) va fi *2pq*, dublul frecvenței bărbaților afectați (*2q*), deci mult mai mare decât a femeilor afectate, homozigote (q^2). De exemplu, în cazul *cecității pentru culorile roșie și verde* (produse de mutații ale genelor pentru pigmentul vizual situate pe cromozomul X), frecvența bărbaților afectați este 8%, deci frecvența genei mutante este q = 0,08, iar a genei normale p = 0,92. Incidența femeilor afectate (q^2) este foarte mică $(0,08)^2 = 0,0064$, deci sub 1%, dar frecvența femeilor

heterozigote este $(X^N X^a) = 2\,pq = 2 \times (0{,}92) \times (0{,}08) = 0{,}147$, deci în jur de 15%.

În cazul afecțiunilor dominante legate de X (de exemplu, *rahitismul rezistent la vitamina D* sau hipofosfatemic) situația este inversă: frecvența bolii va fi de două ori mai mare la femei decât la bărbați.

3.2. *Evaluarea rentabilității unor programe de depistare a unor boli genetice*

Introducerea unor programe de depistare a unor boli genetice la nou-născuți este dependentă, printre altele, de frecvența bolii în populație. De exemplu, frecvența (q^2) a *bolii Tay-Sachs* la evreii aşkenazi este de circa 1: 3.600; deci frecvența alelei mutante (q) este 1: 60, iar a heterozigoților ($2pq$), de circa 1: 30. Frecvența cuplurilor heterozigote ($Aa \times Aa$) care prezintă riscul naşterii unui copil afectat este $2pq \times 2pq$ deci aproximativ 1:900. Dacă se presupune că fiecare astfel de cuplu va avea copii, depistarea bolii ar interesa 1.800 de cupluri, pentru a evita naşterea unui copil afectat. În populația generală non-aşkenazi, frecvența bolii Tay-Sachs este de 1:360.000, deci q = 1:600, iar frecvența ($2pq$) a heterozigoților de 1:300. În aceste condiții, depistarea ar trebui să intereseze 180.000 de cupluri, pentru a descoperi un copil bolnav. Rezultă, evident, că depistarea şi limitarea la populația de evrei aşkenazi este mult mai rentabilă decât în populația generală.

B. Factorii care influențează frecvența genică şi genotipică

Echilibrul genic postulat de legea Hardy-Weinberg se realizează în anumite condiții speciale. Legea nu este valabilă decât *în populațiile mari, panmictice* (în care încrucişările sunt aleatorii), *în care nu există mutații sau migrații, iar selecția nu acționează* pentru sau împotriva unui anumit genotip. Aceste criterii sunt îndeplinite pentru caracterele umane normale (grupe sangvine, serice, enzimatice, tisulare) determinate de gene „neutre". Totuşi, în bolile genetice condițiile precizate nu sunt totdeauna realizate, şi o serie de factori pot modifica frecvențele genice şi genotipice în anumite populații umane. Dar amploarea factorilor ce intervin este *limitată*, iar modificările frecvenței genelor sunt *echilibrate* fie la nivelul inițial, fie la un nou nivel. Astfel, legea Hardy-Weinberg rămâne relativ *valabilă* şi poate fi aplicată în practica geneticii medicale pentru a estima frecvențele alelice.

1. Uniunile (împerecherile) neîntâmplătoare

Împerecherea întâmplătoare presupune alegerea partenerului de cuplu, indiferent de genotipul soțului (soției). În realitate, împerecherea nu este, probabil, în întregime, întâmplătoare deoarece deseori intervin un număr de factori, unii cu semnificație genetică, alții, probabil neutri din punct de vedere genetic. Aceşti factori sunt: *stratificarea, căsătoria asortativă şi consangvinitatea.*

a. Stratificare populației

În majoritatea populațiilor umane, uniunile (căsătoriile) sunt deseori *orientate*, în sensul că membrii unei subpopulații – definită pe criterii rasiale, etnice, religioase sau altele – se unesc mai frecvent cu alți membri ai aceleiaşi populații. Acest lucru este firesc deoarece multe populații sunt *stratificate* fiind alcătuite din mai multe subgrupe cu un „profil genic" caracteristic.

> Pe glob, se cunosc numeroase populații stratificate: de exemplu, populația SUA este stratificată în 2 subgrupe majore, caucazieni şi negri, şi numeroase subgrupe cum sunt: americanii nativi, asiaticii, hispanicii. La fel se poate vorbi de o stratificare a populației din Europa, frecvențele genelor variind semnificativ între diferite țări europene.

Uneori unele subpopulații formează adevărate grupuri „*izolate*", populații mici în care membrii lor nu se vor uni (încrucişa) înafara grupului.

> Dacă alegerea partenerului într-o populație stratificată este restrânsă la membrii aceluiaşi subgrup, rezultatul este un *exces de homozigoți şi un deficit corespunzător de heterozigoți* în ansamblul populației pentru fiecare locus cu mai mult de o alelă. Deoarece este de presupus că aceste subgrupe au frecvențe diferite de gene autozomal-recesive anormale şi profilul patologic al acestor subgrupe va fi diferit. Exemplele clasice sunt: boala Tay-Sachs la evreii aşkenazi, thalasemia în populația mediteraniană, drepanocitoza la negrii africani, fibroza chistică şi fenilcetonuria la caucazieni.

b. Împerecherea (căsătoria) asortativă

La fenomenul de stratificare a populației se adaugă *încrucişarea asortativă* sau preferențială, care constă în alegerea partenerului motivată de anumite trăsături particulare. Ea este de obicei *„pozitivă"*, adică oamenii tind să-şi aleagă un partener care să le semene (de exemplu, în funcție de limba maternă, statura, culoarea pielii, dotarea intelectuală, talentul muzical,

performanţele atletice ş.a.). Căsătoria asortativă negativă, adică alegerea unui soţ cu caracteristici diferite de cele proprii, este mult mai rară.

În toate situaţiile în care selecţia partenerului este preferenţială şi deci restrictivă la membrii aceluiaşi subgrup, iar atributele comune se află sub control genetic, se produce la descendenţi *o creştere a frecvenţei genotipurilor homozigote* pentru anumite gene şi o diminuare a frecvenţei heterozigoţilor.

Uneori există tendinţa alegerii partenerilor cu *probleme medicale asemănătoare*, de exemplu surditate congenitală, cecitate, nanism etc. Dacă soţii au tulburări cauzate de aceeaşi mutaţie sau de mutaţii alelice este probabil ca acestea să aibă consecinţe severe asupra descendenţilor. Deşi efectele pe termen lung ale populaţiei sunt neînsemnate, familia direct interesată se poate afla ea însăşi într-o situaţie cu risc genetic important.

c. Încrucişările consangvine

Un aspect particular al uniunilor nonaleatorii îl reprezintă *încrucişările consangvine*, între persoane înrudite printr-un strămoş comun. Frecvenţa lor a scăzut în ultimele decenii, fiind mai dese în anumite subgrupe populaţionale. Doi indivizi sunt consideraţi consangvini dacă au cel puţin un strămoş comun până la a treia generaţie de ascendenţi (stră-străbunic). Ei vor avea mai multe gene în comun decât indivizii neînrudiţi. Ca şi în situaţiile enunţate mai sus se produce *o creştere a posibilităţilor de întâlnire a doi heterozigoţi* pentru aceeaşi genă şi deci o amplificare la descendenţi a proporţiei homozigoţilor bolnavi cu afecţiuni recesive severe, boli poligenice/multifactoriale sau malformaţii congenitale, creşterea mortalităţii precoce, pre- şi post-natale, scăderea longevităţii.

Uneori, căsătoriile consangvine pot face să apară într-o familie boli rare. Este şi cazul celebrului pictor Toulouse-Lautrec, născut într-o familie de aristocraţi francezi, părinţii lui fiind veri primari, care a suferit **picnodisostoză** boală ce se transmite autozomal recesiv şi care se manifestă prin nanism dizarmonic, anomalii craniene, hipoplazia mandibulei, fracturi spontane.

Riscul naşterii unui copil homozigot pentru o alelă recesivă rară este proporţional cu gradul de înrudire (vezi capitolul 6.D.2.3). Pentru verii primari riscul unui urmaş anormal fizic sau mintal este aproape dublu faţă de riscul unui cuplu neînrudit din populaţia generală (1/30 faţă de 1/50); la verii de gradul II riscul se reduce, iar la celelalte grade de înrudire, mai îndepărtate, el este practic neglijabil (exceptând situaţiile în care în fiecare din familiile înrudite există un bolnav cu o afecţiune identică).

Observaţiile privind căsătoriile consangvine sunt foarte vechi. Cunoscute fiind riscurile pentru urmaşii din legăturile consangvine, căsătoriile între rudele de sânge sunt interzise în multe ţări, dar nu pretutindeni şi nu în toate timpurile. De exemplu, faraonii egipteni, în mod legic, se căsătoreau cu propriile surori sau fiice. În India şi Japonia căsătoriile consangvine erau uneori dorite şi dirijate pentru întregirea averilor. Astfel, în anumite perioade istorice, căsătoriile consangvine au atins procente de 20-40%. În zilele noastre se remarcă totuşi o tendinţă de scădere: în Japonia şi multe ţări arabe căsătoriile consangvine sunt estimate la 13-15%, în India la 10%, în timp ce în Europa ele nu depăşesc 0,3%.

Legal, astăzi în toate societăţile umane este prohibită căsătoria între rude de gradul I (incest). Riscul de a naşte copii deficienţi din căsătorii între rude de gradul I, de exemplu frate-soră sau tată-fiică, este de 30-60%. Incestul este prohibit în societăţile moderne, dar a fost susţinut în unele culturi cum au fost cele incaşe sau egiptene. Huascar, ultimul conducător incaş din Peru, a fost produsul a 9 căsătorii frate-soră, a unei căsătorii mătuşă-nepot şi a unei căsătorii de veri primari în 11 generaţii consecutive. Legendara regină Ptolemeică, Cleopatra VII, a fost descendenta unei căsătorii frate-soră şi a multor generaţii de consangvinitate. Intelectul şi frumuseţea ei au fost cu totul ieşite din comun. Ea s-a căsătorit cu 2 tineri fraţi ai ei, Ptolemeu XIII şi Ptolemeu XIV, dar nu a avut cu ei copii. În schimb, ea a născut un fiu pentru Iulius Cezar şi doi gemeni pentru Marc Antonius.

Linia de demarcaţie între legal şi ilegal variază între diferite ţări. Astfel, în aproape jumătate din SUA, căsătoria unchi-nepoată, mătuşă-nepot şi veri primari este interzisă prin lege. În cele mai multe societăţi africane, căsătoriile consangvine nu sunt permise. În Marea Britanie, cea mai apropiată uniune legală este căsătoria între dubli veri primari (ambele seturi de bunici în comun). În ţara noastră, Codul Familiei prevede că *„este oprită căsătoria între rudele în linie dreaptă, precum şi între cele în linie colaterală până la al patrulea grad inclusiv"*.

2. Mutaţiile

Mutaţiile determină o modificare sau o pierdere a funcţiei unei gene, care se poate transmite celulelor fiice şi eventual generaţiilor următoare şi care duce la apariţia unor caracteristici noi – utile, neutre sau defavorabile (vezi subcapitolul 7.A.1). Mutaţiile favorabile au jucat un rol important în lunga evoluţie biologică a omului, ce a atins un maxim greu de depăşit. Marea majoritate a mutaţiilor noi sunt *defavorabile* şi tind să rupă echilibrul genic din populaţie.

Amploarea efectului defavorabil al unei mutaţii se poate aprecia prin consecinţele sale asupra *capacităţii biologice de supravieţuire şi reproducere* (în

limba engleză – *fitness*) sau asupra *indicelui de fertilitate* al individului. El reprezintă principalul (după alţii, unicul) factor ce determină dacă o genă mutantă este „pierdută" imediat, supravieţuieşte câteva generaţii sau devine o alelă predominantă. O mutaţie poate fi *letală* atunci când nu se transmite la generaţia următoare, deoarece afectează supravieţuirea sau reproducerea (duce la moarte sau sterilitate). Exemple: *osteogenesis imperfecta tipul 2* (boala oaselor de „sticlă"), *sindromul Apert* (acrocefalosindactilie), *displazia tanatoforică* etc. Mutaţiile *subletale* reduc rata de reproducere; de exemplu, în *acondroplazie* (o formă de nanism cu membre scurte) indicele de fertilitate este 0,20.

Mutaţiile se produc continuu, în toate genele, şi efectele lor defavorabile realizează în ansamblu „povara genetică" sau reducerea cumulată a capacităţii reproductive cauzată de către toate mutaţiile produse la toţi indivizii unei populaţii. Mutaţiile dominante sau recesive legate de X se exprimă la heterozigoţi şi, respectiv, hemizigoţi. În schimb, mutaţiile recesive, destul de frecvente, nu se manifestă la heterozigoţi. În acest caz, „povara genetică" se poate măsura prin creşterea ratei deceselor printre urmaşii căsătoriilor consangvine (care, aşa cum s-a precizat, favorizează întâlnirea a doi heterozigoţi pentru aceeaşi genă şi creşterea proporţiei descendenţilor homozigoţi). S-a calculat că fiecare persoană normală poartă (posedă) în stare heterozigotă trei până la cinci gene recesive, letale la homozigoţi; ele diferă însă ca tip de la o persoană la alta.

Efectul negativ al mutaţiilor asupra echilibrului genic din populaţie este totuşi redus din cel puţin două motive majore.

- Majoritatea genelor umane au *o rată de mutaţie relativ mică*, de ordinul 10^{-6}-10^{-5} per locus/gamet/generaţie.

  Excepţie fac două boli genetice cu rată mare de mutaţie, de ordinul 10^{-4}. Acestea sunt neurofibromatoza de tip 1 (NF1) şi distrofia musculară Duchenne (DMD); în ambele cazuri, rata înaltă a mutaţiilor se poate explica prin talia foarte mare a genelor (350 Kb în cazul NF1 şi circa 2 Mb în cazul DMD), ceea ce le face mai vulnerabile la mutaţii.

- Efectul mutaţiilor este influenţat şi, în mare măsură, *contrabalansat de selecţie*, păstrându-se astfel un echilibru genic. Menţinerea unei frecvenţe genice constante se realizează prin înlocuirea genelor anormale, pierdute prin deces sau sterilitate într-o generaţie, cu mutaţii noi în generaţia următoare. Cu cât indicele de fertilitate este mai mic, cu atât proporţia pacienţilor la care boala se produce prin *neomutaţii* este mai mare; aşa se întâmplă în distrofia musculară Duchenne sau în acondroplazie. În schimb, în bolile la care debutul simptomatologiei clinice este tardiv şi fertilitatea cvasinormală, neomutaţiile joacă un rol minor, ca spre exemplu, în coreea Huntington.

3. Selecţia

Selecţia este unul dintre factorii importanţi ce intervin în modificarea frecvenţei genelor în populaţie. Ea poate fi *naturală*, independentă de acţiunea omului, sau *artificială*, consecinţa intervenţiei sale active.

Selecţia naturală reprezintă acţiunea factorilor de mediu asupra fenotipurilor determinate de mutaţii noi, pe care le sortează, favorizând fenotipurile utile (cu capacitate de adaptare ridicată) pentru individ, populaţie şi specie. Genotipurile dezavantajoase sunt *selectate negativ* (eliminând genele mutante fie prin mortalitate înaintea reproducerii, fie prin scurtarea perioadei reproductive, fie prin infertilitate sau sterilitate) şi contribuie cu foarte puţine gene la fondul generaţiei următoare: genotipurile avantajoase sunt *selectate pozitiv* (menţinute) şi contribuie cu un număr mare de gene la generaţia următoare. Astfel, selecţia stabileşte *cota relativă de gene* prin care indivizii cu genotipuri diferite contribuie la fondul comun de gene al populaţiei, în funcţie de viabilitatea şi fertilitatea lor. Prin aceasta, selecţia este un factor important în modificarea frecvenţei genelor în populaţie.

Selecţia naturală nu trebuie înţeleasă ca „*o luptă pentru existenţă*" sau „*o supravieţuire a celor mai apţi*" – aşa cum era interpretată de către darwinişti. Selecţia naturală este o problemă de „*reproducere diferenţiată*" (supravieţuirea celor mai apţi pentru a lăsa urmaşi). Genotipurile noi realizate prin mutaţii nu au aceeaşi viabilitate şi fecunditate. „*Aptitudinea biologică de supravieţuire şi reproducere a indivizilor*" (*fitness*) este diferită pentru fiecare genotip; selecţia favorizează indivizii cu cea mai ridicată capacitate de reproducere şi elimină variaţiile care slăbesc/anulează potenţialul reproductiv. *Selecţia naturală acţionează deci prin diminuarea sau creşterea aptitudinii biologice reproductive* (fitness) *a indivizilor cu mutaţii.*

Indicele de fertilitate (f) măsoară aptitudinea reproductivă a unui individ şi deci contribuţia sa la fondul genetic al generaţiei următoare; valoarea lui f poate oscila între zero (alelă letală, în sensul că anulează fertilitatea, chiar dacă modificarea fenotipică nu este letală) şi 1 (indicele de fertilitate al alelei normale). Trebuie subliniat că indicele de fertilitate este parametrul cel mai util în compararea diferitelor genotipuri într-o populaţie, dar el este valabil în contextul unui mediu particular în care există o diferenţă de *fitness*.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Există, schematic, patru moduri de acțiune a selecției naturale:

- contra mutațiilor dominant autozomale;
- contra homozigoților (sau hemizigoților) recesivi;
- contra heterozigoților;
- în favoarea heterozigoților.

Primele trei tipuri duc la o incapacitate în transmiterea genei prin reducerea duratei de supraviețuire și/sau infertilitate. Indicele de fertilitate scade uneori până la zero. Al patrulea tip de acțiune a selecției naturale favorizează heterozigoții comparativ cu ambele tipuri de homozigoți. Frecvențele actuale ale alelelor mutante sunt rezultatul echilibrului între „pierdere" prin selecție și „câștig" prin mutații noi ± avantajul selectiv al heterozigoților.

(1) Selecția contra mutațiilor dominant autozomale

O genă dominantă defavorabilă este supusă direct selecției, deoarece ea se manifestă fenotipic la heterozigoți, ca și la homozigoți. Selecția acționează rapid și transmiterea mutației la generațiile următoare depinde de aptitudinile de supraviețuire și reproducere ale indivizilor ce au mutația. Unele boli autozomal dominante (de exemplu, *osteogenesis imperfecta* tipul 2; acrocefalosindactilia Apert; displazia tanatoforică) sunt *letale*, au un *fitness* zero și se produc numai prin mutații noi. Alte boli dominante sunt *subletale* și au o rată de reproducere redusă; de exemplu, în acondroplazie indicele de fertilitate este 0,20, deci numai 20% dintre genele pentru acondroplazie trec de la o generație la alta. Restul de 80% gene mutante, necesare menținerii constante a frecvenței acondroplaziei în populație, provin prin mutații noi.

(2) Selecția contra mutațiilor recesive defavorabile

În acest caz, selecția este mai puțin eficientă și foarte lentă, deoarece numai o mică proporție a acestor gene sunt prezente și se manifestă la homozigoți; marea lor majoritate sunt „ascunse" la heterozigoți, care au un indice de fertilitate normal. În cazul mutațiilor recesive ale genelor situate pe cromozomul X, selecția se face contra bărbaților hemizigoți. În unele boli letale, de exemplu, *distrofia musculară Duchenne*, bărbații bolnavi nu se reproduc și numai genele prezente la femeile purtătoare sunt transmise generației următoare. Astfel, 1/3 dintre toate genele mutante sunt pierdute în fiecare generație și ele vor fi înlocuite prin mutații noi păstrând frecvența constantă a bolii. În alte boli mai puțin severe, de exemplu, hemofilia, o parte dintre bărbații afectați se pot reproduce, și proporția cazurilor de hemofilie care rezultă prin mutații noi este de obicei 15%.

(3) Selecția contra heterozigoților

În cazul sistemului de grup sangvin Rh la femeile Rh negative (*dd*) se realizează o selecție contra fetilor Rh pozitivi, heterozigoți (*Dd*), care dezvoltă boala hemolitică a nou-născutului. Dar incompatibilitatea materno-fetală poate fi în prezent prevenită prin administrarea globulinei imune anti-Rh; în felul acesta, selecția contra heterozigoților nu va mai avea loc și, în timp, va crește incidența alelei recesive Rh-negative.

(4) Selecția în favoarea heterozigoților

În anumite condiții de mediu, heterozigoții pentru anumite boli au un avantaj selectiv față de ambele categorii de genotipuri homozigote. Aceasta va determina o creștere a frecvenței unei alele, care reduce sever supraviețuirea și reproducerea la homozigoții recesivi (*aa*). Exemplul clasic de avantaj selectiv este rezistența la malarie a heterozigoților pentru *sicklemie* (drepanocitoză). În regiunile în care malaria este endemică (de exemplu, Africa de Vest) homozigoții normali sunt vulnerabili la infestare și vor avea o fertilitate mai redusă comparativ cu heterozigoții, în eritrocitele cărora nu se pot dezvolta protozoarele parazite din genul *Plasmodium* (introduse în organism prin înțepăturile țânțarilor *Anopheles*). În consecință, în aceste regiuni frecvența genei mutante pentru HbS crește în timp. Protecția heterozigoților contra malariei reprezintă o explicație plauzibilă și pentru frecvențele crescute ale altor boli în anumite regiuni: *hemoglobina C*, *talasemia*, *deficiența în G6PD*. Frecvența crescută a *fibrozei chistice* în populația europeană poate fi cauzată de un avantaj selectiv al heterozigoților (incomplet elucidat) față de boala diareică asociată holerei și tifosului.

Situația în care selecția operează în două direcții diferite – eliminând genele nocive prin efectul negativ asupra homozigoților (*aa*), dar avantajând heterozigoții (*Na*) – se numește *polimorfism echilibrat*, deoarece menține constant raportul dintre alele de-a lungul generațiilor.

> Numeroase mutații în regiunile codante ale unor gene sau modificări în secvența nucleotidică a ADN din regiunile necodante sunt „neutre" din punctul de vedere al efectului lor fenotipic. Asupra lor nu acționează – favorabil sau defavorabil – selecția. Și totuși, ele s-au fixat în populație, în absența selecției, prin procese genetice „întâmplătoare". Kimura (1978) a formulat „teoria selecției neutre", în esența ei nedarwiniană; ea nu contestă importanța selecției, dar consideră că aceasta nu reprezintă singurul element care hotărăște soarta mutațiilor.

4. Migrațiile și fluxul genic

Din punct de vedere demografic, migrația reprezintă forma principală a mobilității geografice, rezultând

din schimbarea definitivă a domiciliului stabil între regiuni geografice distincte. Migrația, privită din punctul de vedere al localității de destinație, definește **imigrația,** iar privită din punctul de vedere al localității de plecare, definește **emigrația.**

Din punct de vedere genetic, migrația înseamnă deplasarea unui grup populațional dintr-o regiune geografică în alta, urmată de încrucișarea ei cu populația locală, implicit de un schimb de gene între cele două populații. Efectul migrației este de *creștere a numărului de indivizi heterozigoți și formarea unei populații hibride*. Un bun exemplu de populație hibridă, rezultată prin migrație, se găsește în Hawaii, unde oameni de diferite populații etnice (Polinezieni, Orientali, Caucazieni) sunt căsătoriți între ei.

Migrațiile unui grup etnic/populațional dintr-o zonă geografică în alta și împerecherile (căsătoriile mixte) cu populația indigenă (cu o structură genetică diferită) pot modifica frecvențele alelice în cele două populații. Se produce fenomenul de **flux genic** definit ca o difuziune lentă a genelor dintr-o populație în alta. Rata de schimb a frecvenței genelor într-o populație cu migrație depinde de rata de migrație și de diferența în frecvența genelor între migranți și nativi. Procesul implică populații mari și o modificare gradată în frecvențele genice (deosebindu-se net de deriva genetică care produce variații întâmplătoare în populații mici). În urma imigrării, constelația genică a populației-gazdă se îmbogățește.

Efectele fluxului genelor sunt:

- *îmbogățirea constelației genice a populației-gazdă*; fluxul genelor combină genofondul celor două populații, constituind o nouă structură genică;
- *reducerea consangvinizării* și „spargerea" izolatelor, odată cu creșterea exogamiei; se realizează o reducere a numărului de gameți înrudiți, disponibili pentru încrucișare, ceea ce duce la o scădere a homozigoției și deci o scădere a frecvenței bolilor recesive rare (*efectul Wahlund*);
- *efectul heterozis* (*vigoarea hibridului*), prin care se înțelege o creștere a viabilității, vigurozității sau a fertilității în prima generație de hibrizi datorită heterozigoției.

O dovadă convingătoare a fluxului genic este scăderea gradată a frecvenței grupei sangvine B de la 25-30% în estul Asiei la 6-8% în populațiile Europei de Vest; ea se datorează în mare măsură migrațiilor istorice de la est spre vest ale grupurilor asiatice (în care a apărut prin mutație alela B a locusului ABO) și amestecului lor cu populațiile europene (care inițial nu aveau probabil această genă). Un alt exemplu: s-a observat că frecvența unei alele mutante specifice ce produce *fenilcetonuria* este mare în populația de origine celtică (1:4.500 în Irlanda) și scade în alte populații din nordul și sudul Europei, reflectând migrația geografică a celților.

> Gena *CCR5* codifică un receptor al citokinelor care servește ca punct de intrare în celule a virusului imunodeficienței umane (HIV) ce produce SIDA. Printr-o deleție de 32 pb în această genă se produce o alelă (*CCR5del*) care codifică o proteină nefuncțională; indivizii homozigoți pentru alela *CCR5del* nu exprimă receptorul pe suprafața celulelor și, în consecință, sunt rezistenți la infecția cu HIV. Frecvența alelei *CCR5del* scade de la aproximativ 10% în nord-vestul Europei la câteva procente în Asia și India, fiind virtual absentă în Africa; aceasta sugerează că mutația a apărut în populația din nord-vestul Europei și a difuzat spre sud-est. Epidemia de SIDA este prea recentă pentru a afecta frecvența genică; probabil au intervenit alte fenomene: deriva genetică, fluxul genic sau acțiunea altui factor selectiv (poate o altă boală infecțioasă, cum ar fi ciuma bubonică).

În general, se apreciază că 70-80% din totalul alelelor noi dintr-o populație sunt alele „imigrate". De aceea, migrația este considerată o sursă importantă de variații ereditare.

5. Populațiile reduse

a) Deriva genetică întâmplătoare

Pentru motive diferite (geografice, etnice, religioase, politice), un subgrup *restrâns* dintr-o populație se poate *izola* fizic și/sau social de restul populației, formând un **izolat genetic,** definit ca *o populație a cărei efectiv rămâne restrâns de-a lungul generațiilor și care schimbă un număr redus de indivizi cu alte populații.* Izolatele se pot forma prin două mecanisme: (1) prin desprinderea unui mic grup dintr-o populație, plecarea și stabilirea lui în alte regiuni, păstrând însă comunitatea nou creată, riguros închisă; (2) prin descreșterea, progresivă sau bruscă, a volumului unei populații, populația restantă păstrând caracterul închis.

În populațiile mici, izolate, se poate produce un fenomen care modifică echilibrul Hardy-Weinberg: el este numit **derivă genetică** întâmplătoare. Spre deosebire de populațiile mari, în care *variațiile numărului copiilor* produși de indivizi cu genotipuri diferite nu influențează semnificativ frecvența genelor, în populațiile mici asemenea *variații întâmplătoare* pot modifica, uneori considerabil, această frecvență. Dacă într-o astfel de *populație mică* alela ***A*** este mai frecventă decât alela ***a*** și, *din întâmplare*, indivizii cu alela ***a*** nu au copii sau nu o transmit la descendenți, atunci, după câteva generații, alela ***a*** va dispărea (*se va „stinge"*), iar alela ***A*** se *va fixa* mai puternic, deci se va produce o modificare considerabilă în frecvența

genică. Ori de câte ori, prin şansă, o alelă se „stinge" şi alta se „fixează", se stabileşte o situaţie ireversibilă. Viteza cu care are loc deriva genetică depinde de mărimea populaţiei. Astfel s-ar putea explica frecvenţa crescută a unor grupe sangvine şi boli genetice în anumite populaţii mici, dar deseori este greu de acceptat că deriva genetică este cauza unică a fenomenului.

Într-o populaţie cu efectiv limitat căsătoriile consangvine sunt obişnuite, ele intervenind de asemenea ca un factor perturbator al echilibrului Hardy-Weinberg, prin creşterea frecvenţei genotipurilor homozigote şi o descreştere corespunzătoare a celor heterozigote.

b) Efectul de fondator

O altă explicaţie a incidenţei mari a unor afecţiuni genetice în anumite populaţii este *efectul de fondator (sau „efectul gâtului de sticlă")* care se referă la o reducere drastică a mărimii unei populaţii originare urmată de o expansiune rapidă, în izolare relativă. Dacă membrii fondatori ai unui subgrup poartă, din întâmplare, o genă mutantă recesivă rară, prin încrucişările ulterioare în cadrul subgrupei populaţionale respective se produce o creştere a frecvenţei homozigoţilor şi deci a incidenţei bolii produse de gena mutantă. Se cunosc mai multe exemple: frecvenţa crescută a *bolii Huntington* în regiunea lacului Maracaibo din Venezuela, a *tirozinemiei* în Canada franceză sau a *porfiriei variegata* în Africa de Sud.

Ultimul exemplu este foarte sugestiv pentru efectul de fondator. Populaţia albă afrikander din Africa de Sud a rezultat dintr-un grup mic de imigranţi, în special din Olanda, venit în secolul al XVII-lea; creşterea numerică a fost explozivă, generând circa un milion de indivizi din populaţia actuală. Unul dintre membrii fondatori a prezentat *porfiria variegata*, o boală autozomal dominantă caracterizată prin fotosensibilitate şi fenomene neuroviscerale. Prin încrucişare preferenţială frecvenţa bolnavilor este astăzi de 3:1.000, foarte mare comparativ cu cea din Olanda sau alte ţări ale lumii.

O acţiune combinată a derivei genetice şi efectului de fondator s-a înregistrat în Finlanda, unde populaţia a fost mult timp izolată genetic, geografic, lingvistic şi cultural. La acest fenomen iniţial s-a adăugat în ultimele secole o expansiune populaţională (de la circa 400.000 la aproape 5 milioane). Acestea par să fie explicaţiile posibile ale frecvenţei crescute în Finlanda a circa 20 de boli genetice, rare în alte zone ale lumii (sindromul nefrotic congenital, aspartil-glicozaminuria, coroideremia etc.).

Identificarea unui efect al fondatorului pentru o boală genetică se bazează pe evidenţierea aceluiaşi haplotip (mutaţie şi markeri genetici – microsateliţi, SNP – situaţi în vecinătatea locusului mutant) la majoritatea bolnavilor din populaţie. Haplotipul comun este un argument în favoarea ipotezei unui eveniment mutaţional unic urmat de creşterea frecvenţei alelei mutante în populaţie determinată fie de expansiunea populaţiei asociată derivei genetice ce urmează unei diminuări importante a populaţiei efective datorată epidemiilor, foametei sau războaielor, fie de migraţie şi izolare reproductivă ulterioară (endogamie). Demonstrarea unui efect al fondatorului într-o populaţie are implicaţii importante privind strategia de diagnostic a bolii: o strategie secvenţială, mai puţin costisitoare, poate fi aplicată, în prima etapă fiind testată prezenţa mutaţiei preponderente şi doar ulterior, în absenţa acesteia, fiind testate celelalte mutaţii mai rare.

„Efectul fondatorului" are drept consecinţă, pe plan genetic, sărăcirea rezervorului genetic al populaţiei, sărăcire cu atât mai importantă, cu cât efectivul populaţiei este mai mic. Se poate spune că „efectul fondatorului" favorizează mai puţin speciaţia şi mai mult diversificarea populaţiilor.

În finalul acestei prezentări vom sublinia că specificitatea etnică a unor mutaţii are implicaţii deosebite în aplicarea tehnicilor ADN de diagnostic molecular al bolilor ereditare în anumite populaţii, precum şi faptul că mobilitatea relativă a populaţiilor actuale va reduce considerabil deriva genetică în viitor.

6. Efectele acţiunilor disgenice şi eugenice asupra frecvenţelor genice

a) Eufenia

Eficienţa selecţiei naturale poate fi influenţată prin intervenţia activă igienico-medicală a omului („selecţie artificială"). Ansamblul acţiunilor medicale asupra fenotipului, care urmăresc reducerea efectelor expresiei unor gene mutante defavorabile, este numit *eufenie*. Astfel, se poate realiza o modificare a frecvenţei alelelor prin:

- scăderea vârstei reproductive a părinţilor, care ar putea reduce numărul subiecţilor cu anomalii cromozomiale născuţi din femei de peste 35-40 de ani sau al copiilor cu boli produse prin mutaţii genice când tatăl a depăşit vârsta de 40 de ani;
- diminuarea legăturilor consangvine, în special când în familie există bolnavi cu afecţiuni recesive;
- limitarea acceptată a reproducerii la persoanele cu risc genetic crescut sau folosirea diagnosticului prenatal şi a avortului selectiv; aceste acţiuni reduc posibilitatea transmiterii în generaţia următoare a bolilor autozomal dominante şi recesive legate de X; în contrast, restricţia reproducerii nu va avea efecte asupra incidenţei bolilor autozomal recesive;

- tratamentul medical al bolnavilor cu boli genetice (de exemplu, fenilcetonuria, hipotiroidia) sau multifactoriale (de exemplu, diabet zaharat, diferite malformații congenitale izolate etc.) cu „fitness" nul sau scăzut.

Primele trei categorii de măsuri determină o diminuare a frecvenței genelor anormale; în schimb, tratamentul medical al bolnavilor cu genopatii, care altădată erau excluși natural de la reproducere sau aveau o reproducere dificilă și limitată, crește „aptitudinile lor reproductive" și determină, în timp, o creștere a frecvenței genelor morbide implicate, care altădată erau eliminate. Acest efect de relaxare a selecției este valabil pentru bolile autozomal dominante și legate de X. S-a calculat însă că efectul disgenic al măsurilor genetice și medicale actuale este relativ scăzut.

b) Eugenia

În contextul selecției „artificiale" este important să se discute și problema eugeniei. Termenul, introdus de Francis Galton (1883), semnifică îmbunătățirea populațiilor umane prin încrucișări selective, preferențiale. Eugenia este de fapt controlul opțiunilor reproductive ale individului în beneficiul societății. Se pot deosebi o *eugenie negativă*, care limitează/interzice reproducerea unor persoane cu caractere defavorabile (de exemplu, indivizi cu handicap fizic, senzorial, psihic), și o *eugenie pozitivă*, care urmărește propagarea unor caractere remarcabile prin încrucișare selectivă (de exemplu, inteligența, în cadrul proiectului aberant de inseminare artificială cu gameți laureaților premiilor Nobel sau, mai recent, *clonarea reproductivă*).

Politica eugenică a devenit populară și a fost implementată în America de Nord și Europa, în primele decenii ale secolului XX, datorită largii acceptări a rasismului și darwinismului social în concepțiile păturii conducătoare a timpului. Eugenia a fost folosită ca suport „științific" pentru: politica restrictivă de emigrare în SUA, legile prohibitive ale căsătoriilor pe baza rasei și uneori a handicapului, legile de sterilizare ale unor persoane cu defecte genetice severe sau pentru exterminarea evreilor și a altor minorități etnice de către naziști. Aceste acțiuni discriminatorii au creat ulterior o benefică „reacție adversă" față de eugenie.

Ideile eugenice negative sau pozitive, ferite de exagerări socio-politice, sunt seducătoare. Se pune firesc întrebarea: sunt justificate științific, pot fi acceptate etic? Cunoștințele actuale din genetica medicală nu aduc nici un suport științific programelor eugenice.

- În cazul *eugeniei negative* ne vom referi doar la afecțiunile recesive. Frecvența mare a heterozigoților arată inconsistența măsurilor preconizate de cei care își propun să „amelioreze" specia umană, împiedicând de la procreare bolnavii cu afecțiuni genetice recesive. Aceste măsuri ar suprima un număr foarte mic de gene în raport cu cele transmise de heterozigoți.
- În cazul *eugeniei pozitive* există rezerve științifice serioase: este greu de stabilit ce caractere ereditare sunt benefice. Alelele „pozitive" ale unor oameni dotați se manifestă într-o anumită configurație genică particulară, deseori unică și deci greu de reprodus la descendenți. Formarea gameților presupune un amplu proces întâmplător de recombinare a genelor parentale contrar încrucișării selective reduce diversitatea și limitează astfel capacitățile de adaptare la modificările mediului.

La aceste date genetice, ce contrazic bazele eugeniei, se adaugă și conceptele bioeticii, căci în fond orice program eugenic reprezintă *pierderea libertății personale* prin subjugarea intereselor individului intereselor unei societăți viitoare. Așa cum vom vedea în capitolul 21, dilemele etice ale geneticii sunt mai numeroase, dar în rezolvarea lor *primează de obicei libertatea de opțiune a individului*. Și totuși, există câteva probleme „fierbinți", iar în contextul discuției despre eugenie trebuie remarcat faptul că diagnosticul prenatal, care prin perfecționarea și simplificarea tehnicilor se extinde treptat la un număr tot mai mare de femei gravide, este în fond o modalitate de selecție a fetușilor și de „eradicare" a unor boli prin eliminarea pur și simplu a fetușilor afectați. Suntem confruntați cu o nouă dilemă: *„to kill or not to kill – that is the question"*. Or, misiunea medicilor este de a îngriji înainte de a fi judecători.

C. Originea și evoluția populațiilor umane

Originea și evoluția speciei umane este unul dintre subiectele cele mai larg dezbătute în decursul timpului de către diferite categorii de specialiști care, într-un efort comun, au încercat să înțeleagă și să reconstituie pas cu pas procesul complex al devenirii speciei umane. În această acțiune, tehnologiile geneticii moleculare au deschis recent noi posibilități de abordare a procesului de evoluție a omului modern. *Antropologia moleculară* a furnizat deja numeroase informații despre evoluția speciei umane, legăturile sale cu celelalte specii de primate, asemănările dintre oamenii străvechi și cei actuali, migrațiile populațiilor

BCU IAȘI CENTRU UNIVERSITAR

ancestrale sau legăturile genetice dintre populațiile umane actuale. Datele obținute sunt foarte prețioase dar, încă insuficiente pentru a rezolva fără echivoc multiplele și complexele probleme ale originii și evoluției speciei umane.

Înainte de a prezenta „scenariul" devenirii omului anatomic modern, *Homo sapiens* (*„omul înțelept"*, în latină), vom preciza că trăsăturile sale morfo-funcționale l-au plasat în clasificările zoologice în ordinul Primate, subordinul Antropoide, familia Hominidae, subfamilia Hominine, genul *Homo* – care include specia *Homo sapiens*[2] (din care derivă omul modern) și alte aproximativ 15 specii strâns înrudite, care au dispărut.

1. Evoluția omului. Dovezile paleoantropologiei

Istoria evoluției liniei umane sau *antropogeneza* reprezintă studiul originii și evoluției omului inteligent (*Homo sapiens*), ca o specie distinctă de *hominine*. Studiul *evoluției umane* se bazează pe datele multor discipline, incluzând antropologia fizică, arheologia, primatologia, genetica, lingvistica.

Reconstituirea procesului de evoluție a omului s-a făcut în primul rând pe baza *studiului fosilelor* scoase la lumină din rocile epocilor geologice, dar și pe baza unor dovezi moleculare (paleogenetică). Datarea fosilelor, analiza comparativă a caracterelor anatomice, distribuția lor geografică și probelor moleculare au permis paleoantropologilor alcătuirea unei diagrame a evoluției omului (figura 8.1), care este – în mod firesc – și incompletă și, probabil, provizorie.

1.1. Apariția speciei umane

Strămoșul comun din care au descins homininele a trăit în Africa în urmă cu circa 8 milioane de ani. Separarea liniilor care au dus la diferite specii de primate actuale, inclusiv a genului *Homo*, s-a făcut *succesiv și progresiv*: acum circa 8 milioane de ani (Ma) s-au desprins strămoșii *genului Gorilla*, iar ulterior (acum circa 6-7 Ma) s-a produs separarea, dintre *linia umană*, din care a evoluat *genul Homo*[3], și *genul Pan* (linia cimpanzeilor)[4].

Separarea ramurii din care a evoluat genul Homo s-a realizat foarte probabil în Africa de Est, în regiunea marelui rift african numită și *„leagănul umanității"*, această localizare fiind și la originea numelui dat acestei ipoteze, *„East Side Story"*. Primele forme considerate cu certitudine a fi înscrise pe linia umanizării (figura 8.2) sunt două specii aparținând genului *Ardipithecus* (5,6 - 4,4 Ma)[5]. Această linie se continuă cu genul *Australopithecus* ce cuprinde un grup de specii care au trăit în Africa între 4,4 și 1,8 milioane de ani în urmă.

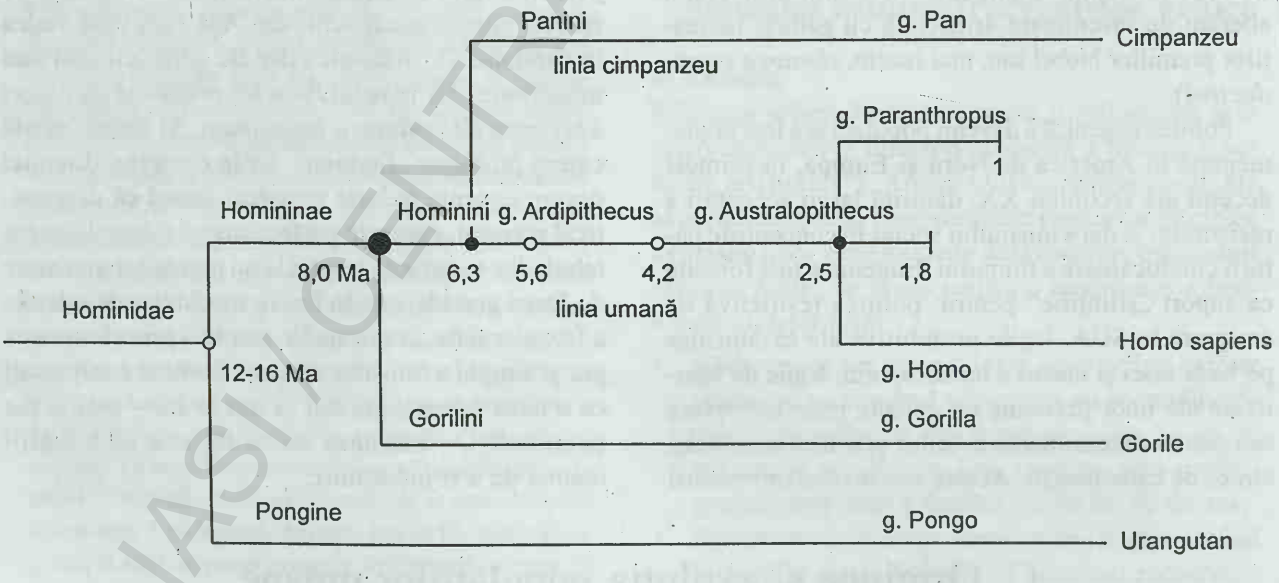


Figura 8.1. Etapele principale ale evoluției *hominidelor*

2. Până în 2003, specia *Homo sapiens* era subdivizată în două subspecii: *Homo sapiens sapiens*, din care derivă omul modern, și subspecia *Homo sapiens Neanderthalensis*, ce include „vărul nostru" – omul de Neandertal. Această terminologie *trinomială* nu mai este în vigoare, omul modern și strămoșii apropiați sunt considerați ca fiind *Homo sapiens*.
3. Primele fosile de *hominini* identificate au fost *Sahelanthropus tchadensis* (craniul *Toumai* de circa 7 Ma) și *Orrorin tugenesis* (circa 6 Ma), probabil primul hominin biped.
4. Cimpanzeii sunt cei mai apropiați de oameni, dar nu strămoșii lor.
5. *Ar. ramidus* (cunoscut și sub numele de *„Ardi"*) și *Ar. kadabba*.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

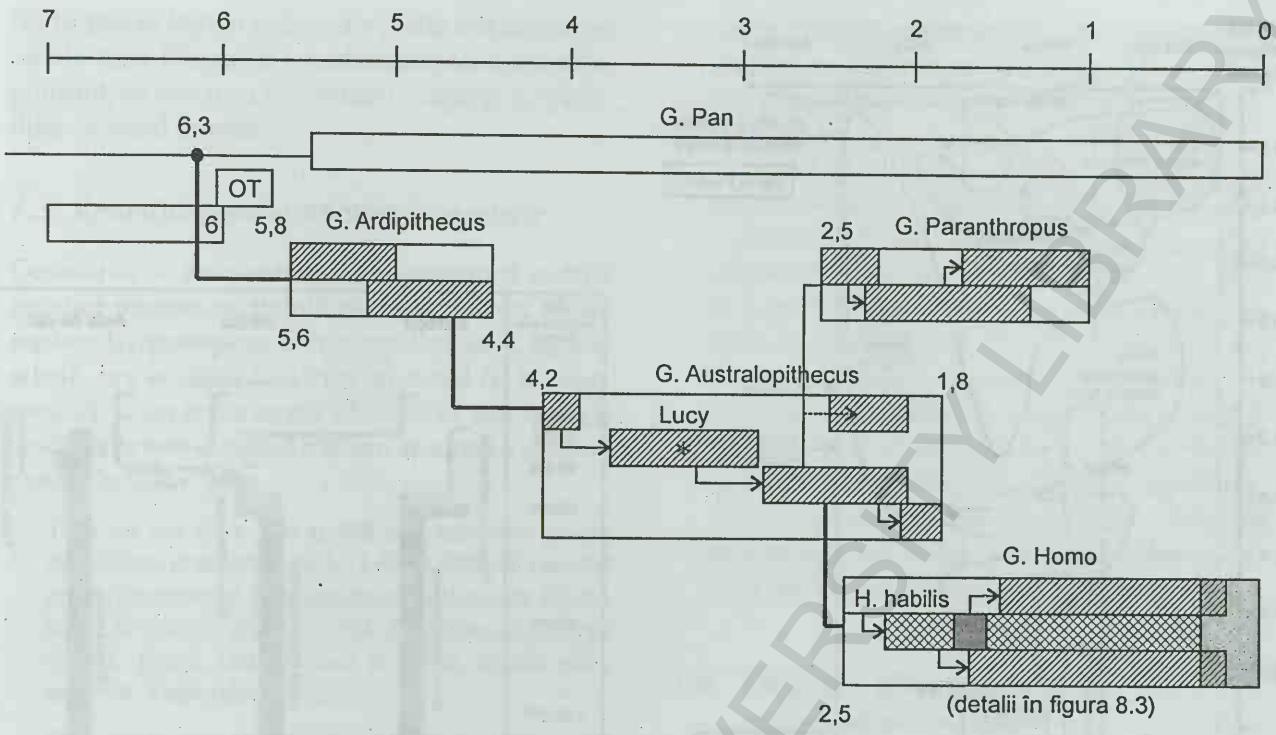


Figura 8.2. Succesiunea în timp a diferitelor specii ale genului *Homo*

Australopitecii se caracterizau printr-o capacitate craniană de 400–500 cm^3, comparabilă cu cea a cimpanzeului, dar spre deosebire de acesta aveau mers biped. Cel mai mediatizat australopitec este *A. afarensis*, reprezentat de „***Lucy***", o fosilă descoperită în 1974 la Afar, în Etiopia și datată cu o vechime de 3,2 milioane de ani.

O ramură a australopitecilor, probabil *A. africanus* (prin *A. Kenyanthropus*), a evoluat acum 2,3-2,4 Ma spre reprezentanții arhaici ai *genului Homo,* strămoșii noștri direcți. (figura 8.3.a)

Oamenii arhaici au evoluat continuu, de la *Homo habilis până la H. Rhodensiensis,* timp de circa 2,4 Ma de ani (figura 8.3.a), și acum circa 200.000 de ani (în Paleoliticul mijlociu) au apărut, în Africa, primii reprezentanți ai *omul anatomic modern*; ei au migrat ulterior (acum 70.000) în afara Africii (*ipoteza „Out of Africa"*) și s-au răspândit pe toate continentele, înlocuind progresiv oamenii arhaici.

În opinia paleoantropologilor, evoluția omului a fost marcată de patru evenimente-cheie: trecerea la viața terestră, locomoția bipedă, encefalizarea și civilizația (cultura). Fiecare dintre aceste evenimente unice a determinat o serie de noi adaptări morfo-funcționale[6] și comportamentale care au orientat evoluția spre omul modern.

Mai trebuie precizat că evoluția genurilor *Australopithecus* și *Homo* nu a fost lineară (deci un proces continuu și regulat în care fiecare specie este strămoșul alteia), ci arborescentă (figura 8.3), unele specii trăind concomitent în aceleași regiuni, fiind posibilă chiar o încrucișare (rehibridare) și schimb de gene (de exemplu, australopitecii și parantropii[7] au coexistat în Africa, acum 2 Ma, cu primii oameni arhaici, iar Neandertalienii au coexistat în Europa, acum 40.000 de ani, cu primii oameni moderni).

1.2. Primii oameni arhaici

Cei mai vechi reprezentanți ai genului *Homo* (figura 8.3.a) au fost *Homo habilis*[8] și *Homo rudolfensis* care au trăit în Africa acum 2,3-1,6 Ma și se caracterizau prin bipedie[9] cvasiexclusivă, craniu rotunjit cu capacitate mai mare de 600 cm^3 (superioară genului *Australopithecus*), reducerea feței și aparatului masticator, menton mai proeminent.

6. Creșterea capacității de prehensiune a mâinii, cu police opozabil, care fac din mână un „instrument uman" important prin precizie și forță; schimbarea modului de hrănire (prin folosirea cărnii, mai bogată în energie și proteine); reducerea aparatului masticator și coborârea laringelui și osului hioid; achiziția și dezvoltarea limbajului natural, a organizării sociale (în perechi și apoi în grupuri mari) și comportamentului modern (gândire simbolică și creativitate culturală).
7. Genul Paranthropus sau „australopitecii robuști" a evoluat din genul Australopithecus acum 2,5 Ma coexistând în Africa cu genul *Homo.*
8. În 2010 a fost descoperită o altă specie de om arhaic, *Homo gautengensis,* care a trăit în Africa de sud înainte de *H. Habilis*, probabil acum 2 Ma.
9. Mersul biped (și consecințele sale asupra coloanei vertebrale și membrelor) este considerat a fi primul caracter specific liniei umane apărut în evoluție.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

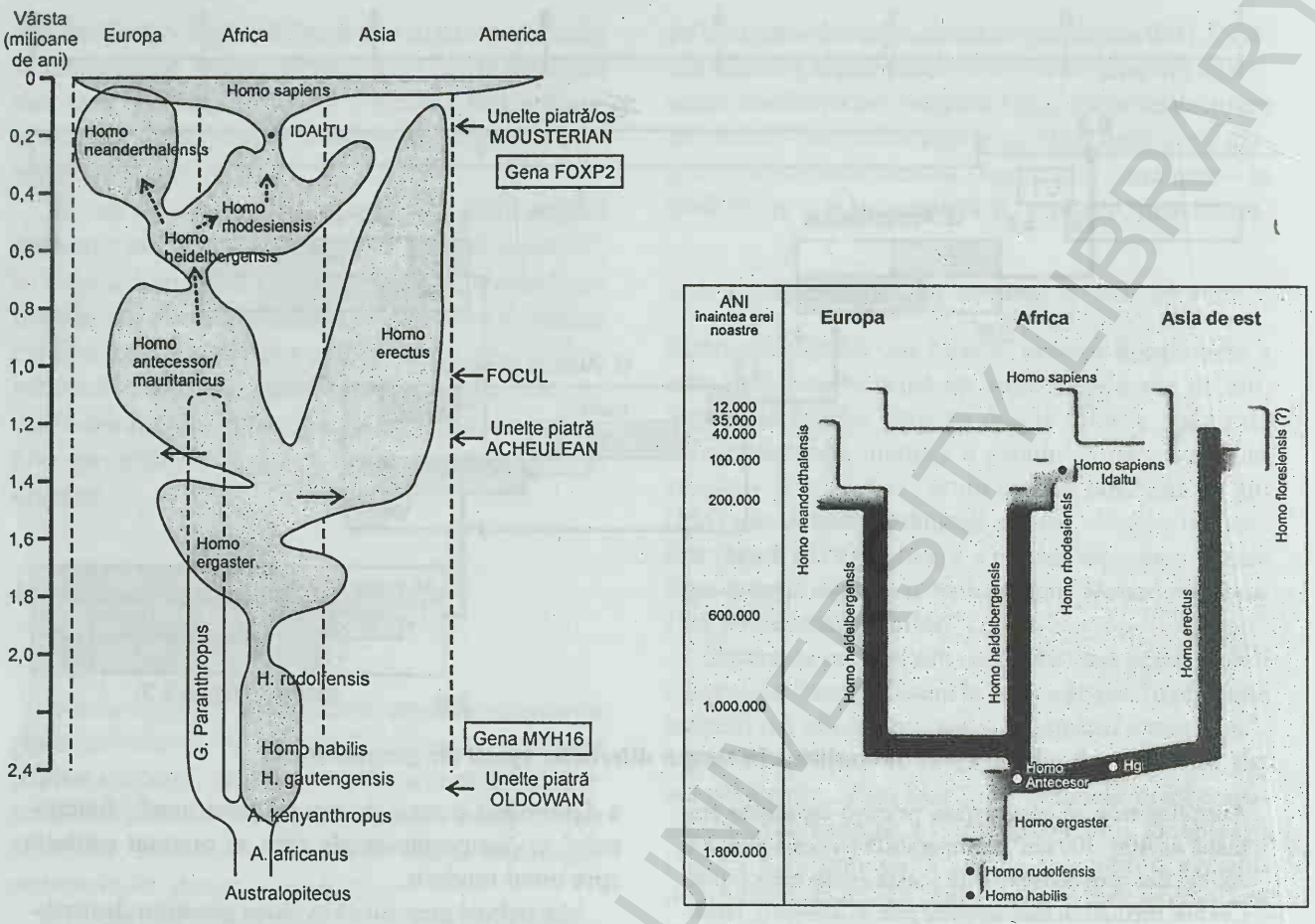


Figura 8.3. Evoluția liniei umane (genul *Homo*), de la oamenii arhaici până la omul modern

(Modificat după Wikipedia)

Un posibil descendent din *H. Habilis*[10] a fost *Homo ergaster*, care a trăit acum circa 2,0-1,4 Ma. Avea talie mai mare, bipedie exclusivă, capacitate craniană mai mare de 800 cm^3, limbaj articulat. Adaptarea mai bună la mersul biped i-au permis să parcurgă distanțe mari și a ocupat progresiv (prin „*coridorul levantin*") „lumea veche", probabil urmărindu-și vânatul. *H. ergaster* a fost primul om arhaic care a migrat din Africa în Asia și Europa.

- *H. ergaster* care a migrat (acum 1,6 Ma) și apoi s-a instalat în Asia a evoluat (figura 8.3.b) spre *H. erectus*[11] (cu schelet foarte robust, capacitate craniană crescută) ajungând (acum circa 1,5 Ma) până departe în China (omul de Peking sau *H. erectus pekinensis*) și Asia de sud-est (omul de Java sau *Pithecanthropus erectus*).
- Populațiile de *H. ergaster* care au rămas în Africa, precum și cele care au migrat spre Europa au evoluat spre *H. antecessor* (a trăit acum 1,2-0,8 Ma) (figura 8.3.a).

H. antecessor este considerat strămoșul altor specii arhaice – *H. heidelgergensis* și *H. Rhodensiensis* – care au trăit acum circa 800.000-250.000 de ani (figura 8.3.b); se caracterizau prin creșterea progresivă a creierului (1.300 cm^3), dezvoltarea graiului articulat, folosirea mai amplă a mâinilor, pentru construirea unor noi unelte din piatră, folosirea focului, organizarea socială.

O ramură evolutivă stinsă, desprinsă din *H. heidelbergensis*, este *Homo neanderthalensis* care a trăit în Europa, între 400.000 și 30.000 de ani în urmă. Neandartalienii aveau o constituție robustă, capacitate craniană de circa 1.450 cm^3, aparat vocal similar morfologic cu al omului modern. Ei trăiau în colectivități mici și izolate, se adăposteau în peșteri, produceau unelte mai sofisticate, foloseau focul și își

10. În 2001, în Georgia, a fost descoperit scheletul fosilei *Homo georgicus* cu o vechime de 1,8 milioane de ani, cu trăsături intermediare între *H. habilis* și *H. erectus*.
11. *Homo floresiensis*, numit și „*omul din Flores*" sau „*hobbitul*", este o specie stinsă desprinsă probabil din *H. erectus* care a colonizat *insula Flores (Indonezia)* între 95.000 și 12.000 ani în urmă. Ea este caracterizată prin mers biped, talie mică (aproximativ 1 m pentru o greutate estimată sub 30 kg) și capacitatea craniană de aproximativ 400 cm^3. În ciuda capacității craniene reduse, *H. floresiensis* avea un creier dezvoltat și folosea atât unelte de piatră, cât și focul.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

confecționau îmbrăcăminte din pieile animalelor pe care le vâna. Dispariția neandartalienilor s-a produs, probabil, ca urmare a modificării climei și a competiției cu omul modern.

1.3. Apariția omului anatomic modern

Cercetările de paleoantropologie precum și studiile genetice recente, au stabilit că omul modern, *Homo sapiens,* își are originea dintr-o populație de *H. sapiens* arhaic care se găsea în Africa (probabil *H. Rhodensiensis*), acum aproximativ 250.000 de ani. Fosilele descoperite[12] evidențiază trăsături anatomice similare omului actual.

> Talia lor era între 160 și 180 cm, scheletul gracil, capacitatea cranianã în medie 1.400-1.600 cm^3 (encefal mărit, neocortex și ganglioni bazali dezvoltați), fruntea înaltă, arcadele sprâncenare slab dezvoltate, pilozitatea redusă. Totuși, fața era ușor prognată, bărbia proeminentă, dinții relativ mari.

Deși prezentau trăsăturile anatomice ale omului modern, primii reprezentanți ai lui *H. sapiens* nu aveau comportamentul acestuia. Reconstituirea modului lor de viață arată că au devenit *moderni comportamental* mai târziu, acum aproximativ circa 70.000 de ani, când probabil a avut loc o „mutație" al cărui efect a fost mărirea plasticității creierului, dezvoltarea capacității de a prelucra informații, de a combina și recombina activități diferite.

> Au căpătat abilitatea de a produce unelte și arme mult mai sofisticate folosind ca materie primă oase și coarne de animale, construiau adăposturi permanente, își confecționau îmbrăcămintea, gravau și sculptau în scop decorativ, produceau obiecte de podoabă, aveau activități artistice, și-au dezvoltat limbajul. Creșterea numerică a populațiilor a determinat apariția competiției și a inovației, a impus schimbări ale regimului alimentar bazat mai mult pe carne și pește, a influențat migrațiile (cauzate și de schimbările climaterice).

Una dintre problemele controversate ale apariției *omului modern* o reprezintă relațiile de înrudire între populațiile umane actuale. Există două ipoteze:

- **Ipoteza multiregională** consideră că *H. ergaster/ H. erectus* a părăsit Africa acum 1,9 milioane de ani și a evoluat către *H. sapiens* într-un timp îndelungat (circa un milion de ani) în zone geografice diferite precum Africa, Europa și Asia, *independent și simultan*, formând populații regionale distincte, care prezintă diferențieri morfologice locale. Această ipoteză are din ce în ce mai puțini adepți.
- **Ipoteza uniregională** („*Out of Africa*") – sau a *originii africane recente a omului modern* („*RAO*") – consideră că *H. sapiens* a apărut doar în Africa de Est, mai târziu, în urmă cu circa 200.000--150.000 de ani, și s-a răspândit în mai multe valuri migratorii (acum circa 60.000 de ani) spre Asia, Europa, Australia și America; au coexistat[13] un timp cu populațiile de *H. neanderthalensis* sau *H. erectus* existente în acele zone și acum circa 30.000 de ani le-a înlocuit complet. *Ipoteza originii unice recente a omului modern* în Africa de Est a fost formulată inițial de Darwin (*Originea omului*, 1871) dar s-a confirmat târziu, după 1980, prin studiile polimorfismelor ADN mitocondrial și cromozomului Y în diferite populații umane actuale.

1.4. Originea africană recentă a oamenilor moderni

Istoria umanității a putut fi descifrată în mare măsură prin studiile de arheogenetică corelate cu cele de paleoantropologie. Urmărindu-se *distribuția* unor markeri ai ADNmt și cromozomului Y în diferite populații actuale, precum și *ordinea lor cronologică de apariție*, s-au obținut informații prețioase privind originea africană unică și recentă a oamenilor moderni, modul si etapele răspândirii lor pe toate continentele lumii (exceptând Antarctica) într-o perioadă surprinzător de scurtă, de numai 45.000 de ani.

Fără a intra acum în detalii, vom preciza că analiza arborelui genealogic construit cu markerii ADNmt a dus la concluzia fermă că toți oamenii actuali sunt descendenții unei femei care a trăit în Africa de Est acum circa 160.000 de ani, numită simbolic *Eva mitocondrială*. De asemenea, s-a stabilit (prin analiza unor markeri ai cromozomului Y) că toți bărbații actuali moștenesc cromozomul Y de la un strămoș masculin, care a trăit în Africa acum circa 60.000 de ani (*cromozomul Y a lui Adam*). Acestea sunt *reperele de convergență* care au putut fi determinate; metodele de analiză moleculară nu ne permit însă să spunem cine au fost strămoșii „primilor bărbați și femei" caracterizați genetic. Important este însă faptul că toți oamenii moderni se aflau în Africa acum circa 200.000 de ani și că până acum circa 60.000 nu exista nici un om modern înafara Africii. Atunci a început „*marele*

12. Primele fosile aparținând omului anatomic modern au fost descoperite în Etiopia și sunt reprezentate de oasele *Omo 1* și *Omo2* de circa 195.000 de ani, *H. sapiens idaltu* de acum 160.000 de ani. În Europa, cele mai vechi rămășițe ale omului modern au fost descoperite recent în România (2002) în *Peștera cu oase* (din Carpații de Sud-Vest, lângă Anina) provenind de la trei indivizi care au trăit acum 35.000, puțin înaintea *Omului de Cro-Magnon* (30.000 ani).
13. Studiile recente au arătat o contribuție genetică redusă (de aproximativ 5%) provenind de la neandertalieni în unele populații umane actuale.

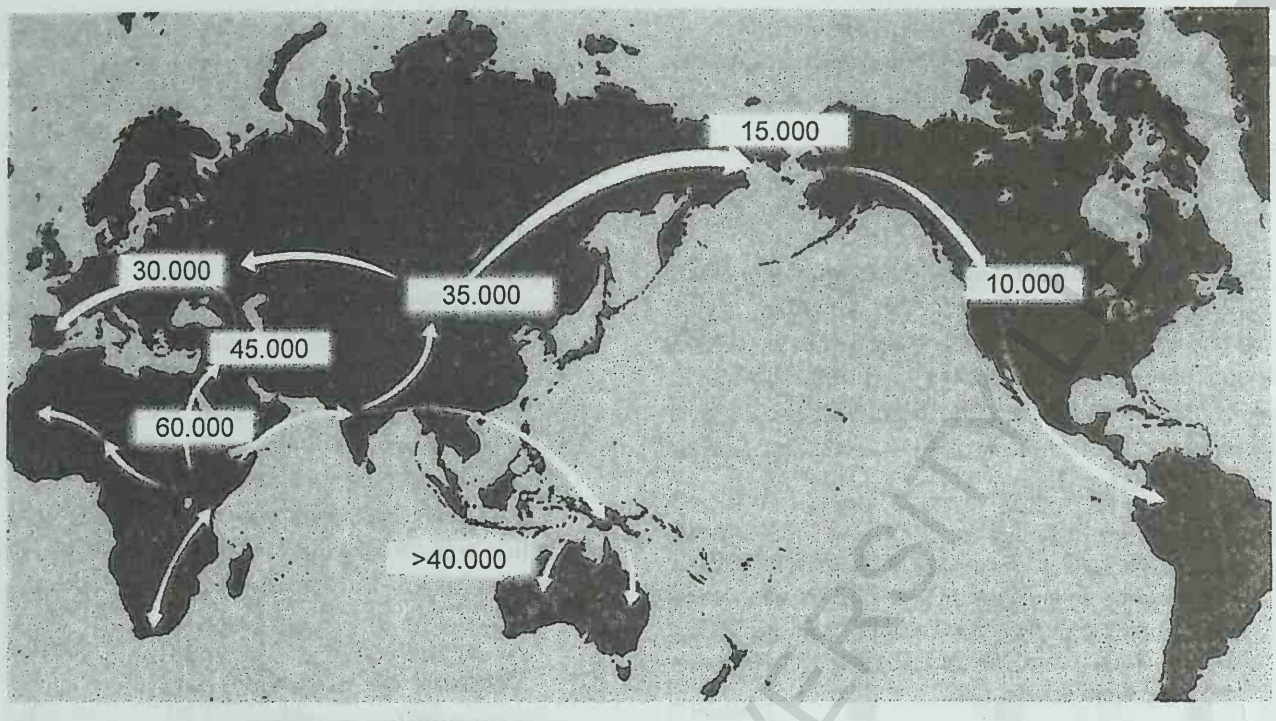


Figura 8.4. Răspândirea filiațiilor cromozomului Y în întreaga lume
(după Wells, 2010)

salt înainte" sau migrațiile „*out of Africa*", determinate probabil de schimbări climatice (seceta „sahariană").

Migrațiile oamenilor moderni s-a produs, foarte probabil, în grupuri mici şi în mai multe „valuri" Numeroase studii recente privind *ordinea cronologică de apariție şi distribuția* unor markeri ai ADNmt, dar mai ales a cromozomului Y în diferite populații actuale, au permis retrasarea acestor migrații istorice (vezi subcapitolul următor şi figura 8.4).

- Prima ieşire din Africa s-a produs acum 60.000 de ani, prin strâmtoarea Bab-el-Mandeb (parțial secată atunci), în sudul Peninsulei Arabice şi apoi migrând de-a lungul litoralului Indiei şi Indochinei, au populat Asia de Sud acum 50.000 de ani şi au ajuns, prin Indonezia, în Australia acum 40.000 de ani.
- „Al doilea val" a început acum 45.000 de ani când un grup din Africa de Est a urcat Nilul şi a ajuns apoi în Sinai şi prin „coridorul Levantin" în Orientul Mijlociu (acum 40.000 de ani) şi Asia Centrală (acum 35.000 de ani). De aici, primele populații umane au urmat mai multe direcții: spre vest, în Europa (acum circa 30.000 de ani), şi spre est, în Asia de Est şi Nord-Est (acum circa 20.000 de ani) de unde au trecut, prin strâmtoarea Bering (înghețată atunci), în Alaska (acum circa 14.000 de ani) populând succesiv America de Nord şi de Sud (acum 10.000 de ani).
- În urmă cu 10.000 de ani au fost colonizate toate continentele lumii (exceptând Antarctica); în circa 45.000 de ani oamenii moderni au călătorit din Africa de Est până în Țara de Foc.

A „doua mare explozie" s-a produs în neolitic, atunci când oamenii au ieşit de sub „controlul absolut al climei" dezvoltându-şi uneltele, agricultura şi creşterea animalelor.

2. Dovezile genetice ale evoluției

Tehnologiile geneticii moleculare au permis extragerea ADN din fragmentele osoase ale unor fosile, analiza secvenței de nucleotide şi compararea cu secvențele ADN ale speciilor actuale. Evaluarea diferențelor dintre secvențele ADN ale unor specii diferite de *hominide* indică gradul lor de înrudire genetică şi momentul scindării dintr-un strămoş comun; cu cât secvențele ADN sunt mai asemănătoare, cu atât speciile respective s-au separat mai recent. Astfel, geneticienii pot reconstitui trecutul preistoric al omului modern folosind modalitățile specifice ale antropologiei moleculare.

2.1. Studiul genetic al primatelor

Studiul genetic al primatelor actuale are un obiectiv dublu: stabilirea gradului de înrudire genetică dintre specii şi construirea unui arbore filogenetic, precum

și descifrarea mecanismelor genetice implicate în evoluție și speciație.

Studiul citogenetic comparativ al cariotipurilor la om (2n=46) și la speciile actuale de cimpanzeu, gorilă și urangutan) (2n=48) a oferit informații prețioase despre evoluția cromozomilor. Principala modificare, esențială pentru evoluția speciei umane, a fost o *fuziune telomerică* a doi cromozomi acrocentrici de la primate, prin care s-a format cromozomul 2 uman (absent la celelalte specii de antropomorfe) și s-a redus numărul de cromozomi de la 48 la 46 (figura 8.5). Alte modificări sunt reprezentate de câteva inversii pericentrice și paracentrice; în rest modelul de distribuție a benzilor cromozomiale este relativ asemănător.

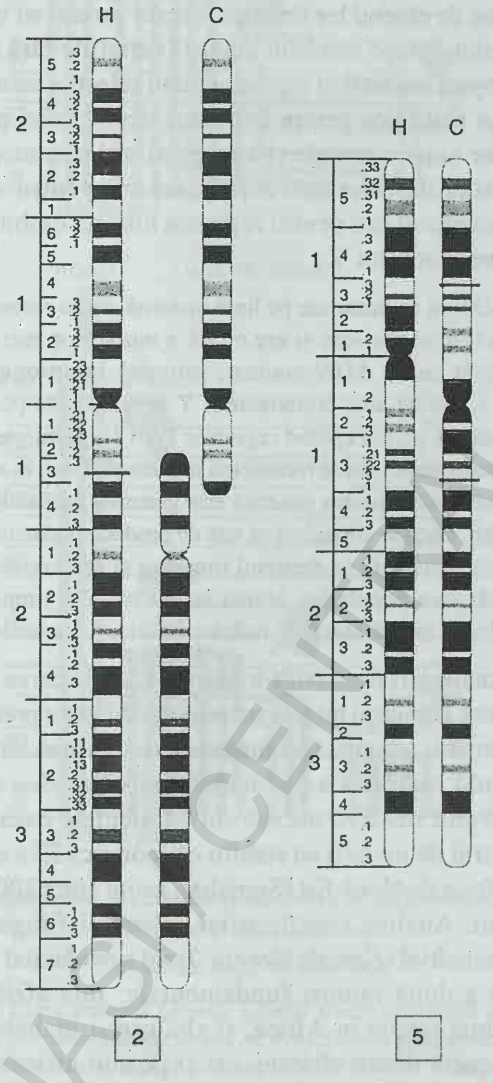


Figura 8.5. Comparație între modelele marcajului în benzi a cromozomului 2 și 5 de la om (H) și cromozomilor omologi de la cimpanzeu (C)

(Modificat după Strachan și Read, 1999)

Studiul secvențelor nucleotidice ale ADN la om și maimuțele antropomorfe relevă că cel mai apropiat de om este cimpanzeul, iar separarea celor două specii dintr-un strămoș comun s-a făcut acum 5-7 milioane de ani (figura 8.1). Mărimea genomului și numărul total de gene sunt aproape identice, există o conservare puternică a sinteniei (gene înlănțuite), iar secvențele de ADN codant analizate au o identitate cuprinsă între 98,5% și 100%. De asemenea, analiza diferitelor tipuri de ADN necodant relevă o similitudine a secvenței de circa 98,5%. Așadar, circa 1,5% (aproximativ 40 de milioane de perechi de baze) din secvența genomică este unică pentru fiecare specie în parte.

Evoluția moleculară poate lua însă forme mai subtile: pierderea sau câștigul de gene, modificări în mecanismele de reglare a expresiei genelor sau evoluția ARN (gene ARN cu funcții noi).

- *Pierderea de gene* se face prin mutații inactivatoare și eliminare, prin selecție. Studiile molecular comparative au arătat că circa 80-90 de gene s-au pierdut pe linia umană după separarea de strămoșul comun cu cimpanzeul. Multe dintre acestea codifică receptori olfactivi; semnalăm inactivarea genei pentru keratina firului de păr (*KRTHAP1*) tip 1, ce a produs subțierea firului de păr, și a genei pentru miozina sarcomerică *MYH16,* prezentă și funcțională la mamifere în mușchii temporali și maseteri. Mutația genei *MYH16* (apărută acum aproximativ 2,4 milioane de ani, la precursorii lui *H. ergaster/H. erectus*) a determinat reducerea volumului mușchilor masticatori, anulând o barieră în dezvoltarea encefalului și determinând în perioada care a urmat o creștere semnificativă a capacității craniene.
- *Câștigul unor gene (prin duplicație) sau a unor funcții noi* au contribuit la o adaptare mai bună în cursul evoluției. În 2006 au fost descoperite în genomul uman regiunile HAR (*human accelerated regions*), 49 segmente din genomul uman conservate în evoluția vertebratelor, dar foarte diferite la om comparativ cu cimpanzeu. De exemplu, HAR1F este asociată cu dezvoltarea creierului, iar HAR2 cu dezvoltarea policelui opozabil. În aceiași categorie a dobândirii unor funcții noi se poate include și mutația genei *FOXP2* (de pe cromozomul 7) care are un rol cheie în dezvoltarea vorbirii și a limbajului articulat la om.

  Indivizii cu mutații ale acestei gene au o formă de dispraxie verbală ce determină dificultăți severe de vorbire. Compararea genei *FOXP2* umane cu variantele ei de la cimpanzeu, gorilă și urangutan a relevat identitatea secvențelor lor cu excepția a două mutații specifice genei umane. Se consideră că mutațiile din gena *FOXP2* determină două efecte principale: abilitatea omului de a coordona mișcări fine ale gurii și laringelui, permițând astfel dezvoltarea limbajul articulat, și modificarea circuitelor neuronale între cortex și ganglionii bazali ce ar asigura abilitatea omului de a îmbina cuvintele

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în propoziții și a da variate sensuri acestora. Aceleași mutații au fost identificate și la *H. neanderthalensis*, demonstrând astfel că varianta umană a genei *FOXP2* era prezentă la strămoșul comun al acestor două specii, cu aproximativ 400.000 de ani în urmă.
Controlul genetic al limbajului uman este însă mult mai complex și în prezent se discută existența unei veritabile *rețele* moleculare ce implică numeroase gene. Gena *FOXP2* codifică un factor de transcripție care reglează alte 300 de gene, printre care și gena *CNTNAP2* (*contactin-associated protein-like 2*) implicată în numeroase tulburări de vorbire și neuro-dezvoltare.

În concluzie, mecanismele care au orientat evoluția primatelor și au realizat divergența între genurile *Homo* și *Pan* au fost unele rearanjări cromozomiale și mutații genice care au contribuit la inițierea desprinderii unor grupuri din populația ancestrală comună. Populațiile care s-au scindat și-au schimbat treptat constituția genetică, diferențele genetice dintre ele s-au extins, au apărut trăsături morfofuncționale distincte, s-au izolat reproductiv și au devenit specii noi.

2.2. *Studiul genetic al fosilelor omului modern (paleogenomica)*

În majoritatea cazurilor ADN formelor fosile nu poate fi analizat datorită degradării sale: fie fosilele depășesc vârsta limită pentru asemenea analize (peste 100.000 de ani), fie s-au păstrat în condiții improprii. Totuși, în pofida acestor limite unele fosile aparținând omului de Neanderthal și omului de Cro-Magnon au putut fi studiate genetic.

- Compararea secvențelor mitocondriale la *H. neanderthalensis* și *H. sapiens* a arătat că ultimul strămoș comun mitocondrial între aceste două specii a trăit între 397.000 și 690.000 de ani în urmă. Studiul comparativ al genomurilor nucleare a arătat o identitate a secvențelor de 99%, identificând atât caractere derivate comune celor două specii (ca, spre exemplu, în cazul genei *FOXP2*), cât și caractere derivate fixate la specia umană datorită fie derivei genetice, fie unei selecții pozitive la strămoșii omului actual. Printre genele omului modern actual care diferă față de cele ale neandertalienilor sunt cele implicate în dezvoltarea abilităților cognitive, morfologia craniului, morfologia pielii sau vindecarea leziunilor. Analiza polimorfismelor demonstrează că 1-4% din ADN omului modern non-african provine de la neandertalieni, ceea ce sugerează că împerecherile dintre indivizii celor două specii au avut loc undeva, în regiunea Orientului Mijlociu și că a existat un flux genic dinspre neandertalian spre omul modern.
- Examinarea ADN nuclear al reprezentanților omului de Cro-Magnon din Europa (ce a trăit în urmă cu circa 40.000 de ani) a relevat similitudinea secvențelor sale, uneori chiar identitatea cu ADN europenilor actuali.

2.3. *Studiile polimorfismelor ADN la populațiile umane actuale*

Analiza comparativă a ADN la populațiile umane actuale poate furniza informații privind trecutul nostru evolutiv și migrațiile populaționale. Rezultatele unor asemenea studii au demonstrat că genomul uman conține numeroase variații individuale reprezentate atât de polimorfismele mononucleotidice (SNPs), cât și de numărul variabil de copii ale unor regiuni extinse ca mărime cuprinse între 1 kb și 3 Mb (CNV). În funcție de efectul lor fenotipic aceste variații au urmat o evoluție după modelul neutru (variațiile fără efect fenotipic) sau au fost supuse acțiunii selecției naturale. De un real folos pentru evaluarea demografiei populațiilor umane actuale și a migrațiilor lor istorice au fost studiile unor secvențe (markeri) pentru ADN mitocondrial sau pentru regiunea non-recombinantă a cromozomului Y.

ADNmt se transmite pe linie maternă, nu se recombină în timpul meiozei și are o rată a mutațiilor mai mare decât cea a ADN nuclear, estimată la aproximativ 1:3.500 de ani; cromozomul Y se transmite pe linie paternă și, exceptând regiunile PAR (regiuni pseudo-autozomale), nu se recombină în meioză. Deci, în aceste cazuri diversitatea genetică este generată numai de mutații. Dacă se consideră că rata de producere a mutațiilor este constantă în decursul timpului și se corelează cu mărimea populației, atunci se pot trasa în timp „originea" și „călătoriile" rudelor noastre ancestrale.

Analiza filogenetică a permis identificarea unui strămoș comun al tuturor secvențelor ADNmt prezente la oamenii actuali. **Cel mai recent strămoș comun pe linia maternă** a fost numit simbolic „*Eva mitocondrială sau Eva ancestrală*". Calculele bazate pe numărul de mutații au stabilit că ipotetica Eva a trăit în Africa de Nord-Est (Somalia), acum circa 200.000 de ani. Analiza ramificațiilor arborelui filogenetic mitocondrial (*Female Genetic Tree*) a evidențiat existența a două ramuri fundamentale: una africană, întâlnită numai în Africa, și alta care-i include atât pe o parte dintre africani, cât și pe non-africani (figura 8.6). Cert este că toți oamenii actuali sunt descendenții Evei mitocondriale. O analiză filogenetică similară a fost realizată folosind secvențele cromozomului Y și datele obținute sunt comparabile cu studiul variațiilor ADNmt. Arborele filogenetic al secvențelor cromozomului Y (*Male Genetic Tree*) a arătat că populațiile africane și non-africane au un strămoș comun, un „tată fondator", numit în mod

BCU CENTRAL UNIVERSITARA LIBRARY

alegoric Adam (*Y-chromosomal Adam*), reprezentat de **cel mai recent strămoș comun pe linia paternă.** Ipoteticul Adam a trăit în Africa, cu aproximativ 60.000-90.000 în urmă, deci cu aproximativ 50.000--80.000 ani mai târziu decât „Eva ancestrală".

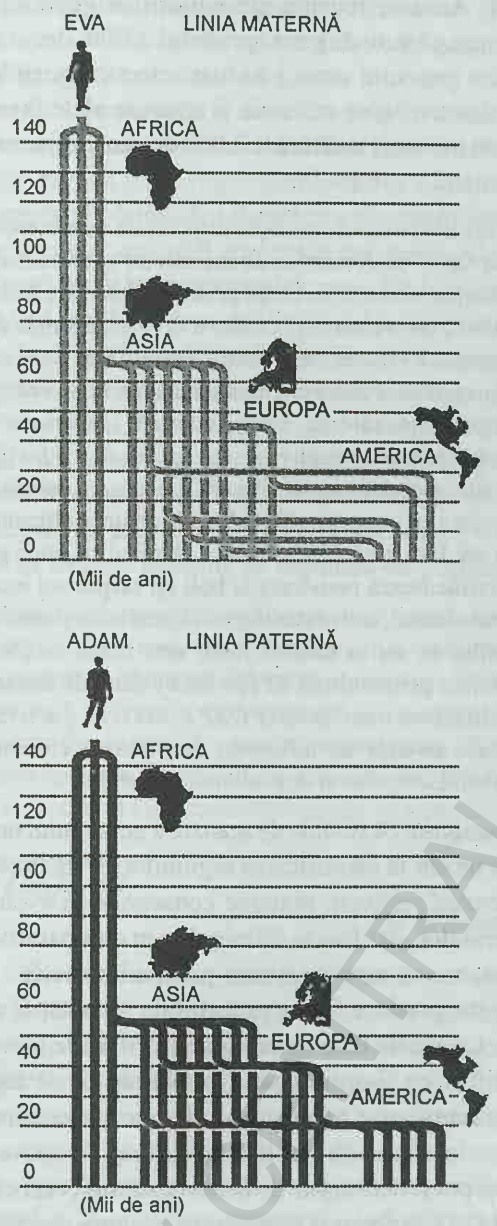


Figura 8.6. Arborele filogenetic al populațiilor africane și non-africane

(modificat după Wade, 2000)

A. Linia maternă (*female genetic tree*) construită pe baza examinării markerilor ADNmt; ramificațiile pleacă de la cel mai recent strămoș comun pe linie maternă (Eva mitocondrială).

B. Linia paternă (*male genetic tree*) construită pe baza examinării markerilor ADN cromozomului Y; ramificațiile pleacă de la cel mai recent strămoș comun pe linie paternă (Adam).

Trebuie subliniat că aceste rezultate nu demonstrează că în perioada respectivă existau numai „Adam" și „Eva" (perechea biblică), ci doar că ADN mitocondrial sau al cromozomului Y al altor femei și bărbați ce trăiau concomitent cu ei în același areal nu s-a transmis la populațiile actuale (probabil datorită unui număr mic de urmași). Nu trebuie uitat că în genomul nuclear uman proporția ocupată de cromozomul Y este redusă și că este foarte probabil ca alte regiuni ale genomului nuclear să provină de la indivizi contemporani lui „Adam" și „Eva". Dar important este faptul că toți oamenii actuali sunt descendenții unor femei care au trăit în Africa de Est acum 200.000 de ani și a unor bărbați care se găseau în aceiași zonă acum 60.000 de ani. Aceasta nu înseamnă că ei au fost primii oameni anatomic moderni; metodele genetice care au dus la aceste „puncte de convergență" nu permit să spunem cine au fost strămoșii lor.

2.4. *Migrațiile primilor oameni moderni „out of Africa"*

Adevărata semnificație a datelor furnizate de analiza markerilor ADNmt și a cromozomului Y constă în faptul că demonstrează ipoteza originii unice recente a oamenilor moderni; a devenit evident că toți oamenii moderni se aflau în Africa acum 200.000 de ani și că nu exista nici un om modern în afara Africii până acum 60.000 de ani, momentul începerii migrațiilor omului modern „*out of Africa*" numit alegoric și *marele salt înainte.*

Urmărind distribuția unor markeri ai ADNmt și ADN cromozomului Y s-a stabilit (cu aproximațiile inerente unui astfel de studiu „retrospectiv") traseul migrațiilor din trecut, susținut și de unele probe paleoantropologice.

Primul grup de oameni anatomic moderni au migrat din Africa de Nord-Est (Somalia), traversând Marea Roșie (prin strâmtoarea Bab-el-Mandeb), în sudul peninsulei Arabice și au generat toate populațiile actuale non-africane. Aceste grup avea markerii M168 pe cromozomul Y și L3 pe ADNmt. De aici, diferite grupuri s-au extins, în mai multe valuri și pe trasee diferite, ocupând întreaga lume. Evident că ADN lor mitocondrial și ADN cromozomului Y au suferit ulterior alte mutații, ce pot fi „datate și urmărite" pe rutele de migrație, în toate continentele (Figura 8.4). Migrațiile oamenilor moderni s-au produs, foarte probabil, în mai multe „valuri".

- Prima migrație litorală din sudul Asiei până în Australia a fost efectuată acum 60.000 de ani de populațiile cu markerii M130 pe ADN Y și M pe ADNmt.
- Un alt grup, non-M130 și non-M s-a deplasat în Orientul Mijlociu; aici a apărut, acum circa 45.000 de ani, mutația M89 pe cromozomul Y și ulterior, acum 40.000 de ani, mutația M9 la un grup ce a migrat spre Asia Centrală, unde condițiile de mediu au permis o expansiune importantă

a populației. Din acest motiv se afirmă că *„Africa este leagănul omenirii, iar Asia Centrală pepiniera ei"*.Tot aici a apărut și mutația M45, acum circa 35.000 de ani.

- Din Asia Centrală grupuri mici (cu markerul M130) s-au îndreptat spre Europa unde au întâlnit acum 30.000 de ani populațiile de neanderthalieni. Alte grupuri (cu markerul M242) au migrat spre Asia de Est (China, Coreea și Japonia) și nord-est (Manciuria), de unde traversând strâmtoarea Bering (înghețată atunci) au ajuns acum 14.000 de ani în Alaska (markerul M3) și apoi s-au răspândit ulterior în America de Nord și apoi de Sud.
- Acestea au fost rutele principale de migrațiune. Studiul markerilor cromozomului Y a permis însă și identificarea altor valuri migratorii secundare, în diferite regiuni din Eurasia și America.

Cert este că în urmă cu circa 10.000 de ani au fost colonizate toate continentele lumii (exceptând Antarctica); în numai circa 45.000 de ani oamenii moderni au călătorit din Africa de Est până în Țara de Foc. În Neolitic s-a produs „marea explozie", atunci când oamenii au ieșit de sub „controlul absolut al climei" dezvoltându-i uneltele, agricultura și creșterea animalelor.

2.5. Co-evoluția gene ↔ cultură

Cu toate progresele înregistrate în ultimii ani de paleogenetică, nu avem încă imaginea completă a evoluției, de la început și până la sfârșit. Datele genetice nu sunt suficiente pentru a înțelege „de ce omul este om și cimpanzeul este cimpanzeu", în condițiile în care diferența genetică este atât de mică, iar implicațiile ei sunt atât de mari. Nu trebuie însă să uităm că omul are o ereditate biologică (*înnăscută*) și una culturală (*dobândită*), fiecare cu legile ei. Evoluția umană a fost condiționată de procese complicate culturale[14] sau negenetice, adevărate resorturi ale supraviețuirii, ce au generat independență față de capriciile mediului ambiant. Nici o altă specie nu a mai creat vreodată o unealtă sau a utilizat focul. Fără cultură am fi rămas o specie care și-ar mai căuta încă rosturile. Cultura este un atribut uman, ea ne-a separat de restul animalelor.

Problema esențială nu este de a stabili care dintre cele două forme de „ereditate" – genetică și culturală – este mai importantă ci de a vedea dacă între ele există o legătură care a contribuit, rapid amplu și puternic, la evoluția umană. Numeroși geneticieni, antropologi și oameni de cultură au impus **conceptul co-evoluției gene-cultură**, considerându-l a fi *modelul dominant ce a influențat evoluția omului în ultimii 50.000 de ani.* La fel ca și factorii naturali de mediu – care au produs *o presiune selectivă* ce a modificat genomul uman, influențând evoluția omului – activitățile culturale au fost o sursă de selecție care a determinat modificarea *frecvenței alelelor* (au modulat genomul uman), influențând decisiv evoluția umană. Analize recente ale variațiilor genetice au evidențiat că sute de gene (probabil 2.000, deci circa 10% din genomul uman) au fost selectate pozitiv ca efect al activităților culturale și anumite alele favorabile s-au transmis la ultimele 2.000 de generații umane, influențând evoluția lor.

> Dintre numeroasele exemple disponibile vom menționa doar faptul că domesticirea animalelor și folosirea alimentației lactate a favorizat gena de toleranță a lactozei la adult, iar creșterea plantelor a favorizat genele citocromului P450 necesare pentru detoxifierea unor compuși vegetali. Folosirea/construirea unor *nișe ecologice* (peșteri, foc, căldură, haine) au creat „medii noi" ce combat efectele selective a unor factori de mediu (frig) iar alte „activități socioculturale" (agregarea, pregătirea alimentelor cu ajutorul focului, obiceiurile alimentare noi etc.) au avut efecte asupra răspândirii unor gene ce influențează rezistența la boli (și răspunsul imun), metabolismul, activitatea digestivă, mărimea și structura dinților și, nu în ultimul rând, activitatea cerebrală. Relațiile gene-cultură au fost însă bilaterale deoarece modificarea unor gene (*FOXP2*, *MYH16* ș.a.), menționată anterior au influențat dezvoltarea creierului, limbajul articulat și dezvoltarea culturală.

Reamintim că studiile de scanare a genomului uman au dus recent la identificarea regiunilor HAR (*human accelerated regions*), puternic conservate în evoluția vertebratelor, dar foarte diferite la om comparativ cu cimpanzeu, ca urmare a unor presiuni selective noi și recente, produse foarte probabil de activitățile culturale. La aceste date se adaugă informațiile privind diversificarea și optimizarea modalităților de reglaj genic identificate recent, mai ales prin mecanisme epigenetice (care nu implică modificări în secvența ADN și pot fi declanșate de factori externi) (vezi capitolul 4.D.1), precum și cele despre evoluția recentă și rolurile multiple (incomplet descifrate) ale ARN necodant (vezi 3.C.3.3). *Cert este că noul concept al co-evoluției gene-cultură* ar putea fi *modelul dominant care a influențat evoluția omului în ultimii 50.000 de ani.*

3. „Rasele" umane

Toate ființele umane care trăiesc în prezent aparțin unei singure specii, *Homo sapiens*. Este adevărat că specia noastră este neomogenă, politipică și polimorfă,

14. Antropologii definesc cultura, în relația sa cu evoluția omului, printr-un complex de „credințe, valori, comportamente și tradiții specifice unei anumite populații".

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

putându-se identifica mai multe grupuri populaționale. Delimitarea lor a fost realizată în trecut, de antropologia clasică, pe baza caracterelor morfologice, vizibile, deosebindu-se trei grupe populaționale mari denumite rase: caucazienii (albi), negrii și asiatici – fiecare cu numeroase subgrupuri diferite. În spiritul geneticii actuale rasele sunt definite, în general, ca fiind grupuri populaționale mari care *au un fond comun de gene*, diferit de la un grup la altul. Deși frecvențele unor alele variază de la o populație la alta, s-a dovedit că frecvențele genice nu au o distribuție superpozabilă delimitării clasice (morfologice) a raselor. Între membrii aceluiași grup rasial pot exista diferențe mai mari decât între principalele rase. De fapt, *analiza genetică spulberă conceptul de rase umane distincte* dovedind faptul că distribuția geografică și populațională a unor caractere genetice nu depinde de culoarea pielii, forma capului sau a corpului etc. Se naște o nouă paradigmă: „toți suntem diferiți, fiecare din noi este unic". La specia umană este inaplicabil conceptul de rasă biologică de la alte specii (caseta 8.1). El trebuie înlocuit cu noțiunea de populație.

Studiul variației genetice a populațiilor actuale a relevat faptul că *între oameni există mai multe asemănări decât deosebiri*. Altfel spus, *diversitatea genetică umană este limitată*. Afirmația este susținută de rezultatele unui număr foarte mare de studii (folosind peste 10.000 de markeri genetici polimorfici), efectuate în ultimul deceniu, în cadrul Proiectului Diversității Genomice Umane (Human Genome Diversity Project), inițiat în 1996. Datele obținute au permis formularea unor concluzii:

- diversitatea genetică individuală în cadrul unei populații naturale depășește cu mult diferențele genetice dintre populații;
- variația genetică a fost estimată la aproximativ 85% în cadrul unei populații, 7% între populații din același continent și 8% între populații din continente diferite;
- cea mai mare diversitate genetică o prezintă populațiile africane, ceea ce dovedește că acestea au cea mai mare vechime; populațiile non-africane s-au separat relativ recent din ramura africană (acum 50.000 de ani);
- diversitatea genetică umană (atât cea nucleară, cât și cea mitocondrială) este mai redusă comparativ cu cea observată printre primate și alte specii animale sugerând apariția mai recentă a speciei umane;
- rasele nu reprezintă populații umane genetic distincte.

Diversitatea genetică limitată a populațiilor umane actuale a fost explicată prin *timpul scurt de evoluție*, evenimentele demografice și *schimburile genice* constante produse de migrația populațiilor. Se crede că populațiile umane sunt genetic similare pentru că au origine recentă și nu au avut timp suficient pentru a-și dezvolta diferențele genetice. *Efectivul numeric al unei populații* este important pentru dezvoltarea diversității genetice. În cursul evoluției umane, la un moment dat, a avut loc reducerea severă a numărului de indivizi din populația predecesoare[15] omului

CASETA 8.1

De la conceptul de rase la... rasism

Cuvântul rasă a fost folosit pentru a caracteriza diversitatea populațiilor umane actuale și el era echivalentul antropologic a ceea ce zoologii denumeau „subspecii", adică „populații asemănătoare fenotipic, ce ocupă o anumită arie geografică și se deosebesc morfologic (forma corpului, capului, culoarea pielii etc.) de alte populații" (după Mayr). Geneza *atribuie originea raselor fiilor lui Noe:* Iafet *pentru europeni,* Sem *pentru asiatici și* Cham *pentru africani. În secolul al XIX-lea antropologia fizică fundamentează conceptul tipologic și reduce diversitatea umană la cele trei tipuri fundamentale: caucazoid, mongoloid și negroid; colonialismul în expansiune adaugă conotații sociale acestei diviziuni, susținând inegalitatea raselor. Dezvoltarea geneticii a infirmat multe din datele antropologiei fizice, demonstrând că diferențele dintre populațiile umane sunt multifactoriale și mai ales că nu există diferențe genotipice majore între așa-zisele rase. Omul modern își are originea într-o singură populație ancestrală; diferitele subpopulații s-au individualizat foarte recent, iar fluxul genic între populații vecine a fost rareori întrerupt perioade mai lungi. Aceasta determină un fond genetic comun întregii umanități.*

În acest context, rasismul sau orice altă discriminare tipologică este încercarea de a explica inegalitățile sociale pe baze biologice. Este adevărat că oamenii sunt diferiți genetic, dar aceasta nu înseamnă că sunt inegali. Principiul egalității în drepturi este fundamental și valabil pentru toată lumea. „Egalitatea este un concept moral care a fost inventat tocmai pentru că ființele umane nu sunt identice" *(F. Jacob). Genele nu sunt egale sau inegale, ci pur și simplu diferite, determinând calități și aptitudini diferite. Diversitatea este cel mai valoros capital al speciei umane.*

15. Unii cercetători, pornind de la ideea, genetic demonstrată, că toți oamenii care trăiesc astăzi sunt descendenții unei populații foarte mici (1.000-10.000 de perechi reproducătoare) care a trăit acum circa 70.000 de ani, consideră că în această perioadă s-a produs o reducere drastică a populației umane ca urmare a dezastrului ecologic global produs de supererupția vulcanului Toba (Sumatra, Indonezia).

modern (efect „*gâtului de sticlă*"), urmată de o expansiune numerică a acesteia. Momentul este plasat acum circa 60.000-70.000 de ani, atunci când o ramură a populației de oameni moderni timpurii a migrat din Africa către Eurasia, generând populațiile non-africane. Cu unele excepții, populațiile umane nu au fost niciodată izolate, migrațiile favorizând răspândirea genelor în cadrul populațiilor.

Se pune totuși firesc întrebarea: cum au apărut diferențele morfologice dintre populațiile umane? Baza genetică a diferențelor genetice dintre populații („rase") și subpopulații este mutația, iar mecanismele care determină aceste diferențe sunt: *selecția mutațiilor* favorabile în funcție de mediu; *fixarea întâmplătoare* a unor mutații neutre sau chiar defavorabile; *izolarea reproductivă* relativă între grupurile populaționale (prin bariere geografice). Evoluția de formare a raselor a fost însă stopată, iar după părerea unor specialiști oprită, prin procesele de omogenizare ale speciei (determinate de mobilitatea oamenilor) și progresele socioculturale. S-a produs și se produce un amestec tot mai intens al diferitelor grupuri care determină unificarea și omogenizarea lor treptată, determinând caracterul unitar al umanității.

„Toate grupele umane, fie că este vorba de rase, în sens tradițional, sau de populație/națiuni în sens actual, au un fond genetic comun, care le conferă aceleași capacități de dezvoltare intelectuală și de progres social. Realizarea lor depinde de condițiile istorice și sociale ale fiecărui popor, ale fiecărei populații" (N. Botnariuc). Evident, orice concepție de inegalitate biologică implicată în evaluarea capacității evoluției și dezvoltării diferitelor grupuri umane este neștiințifică și rasistă.

Bibliografie specifică selectivă

1. Britten RJ. *Divergence between samples of chimpanzee and human DNA sequences is 5%, counting indels*. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:13633-13635.
2. Cheng Z, Ventura M, She X, Khaitovich P *et al. A genome-wide comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications*. Nature 2005; 437:88-93.
3. Gagneux P, Wills C, Gerloff U *et al. Mitochondrial sequences show diverse evolutionary histories of African hominoides*. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:5077-5082.
4. Gibbons A. *Which of our genes make us human?* Science 1998; 281:1432-1434.
5. Green R, Krause J, Briggs A *et al. A draft sequence and preliminary analysis of the Neandertal genome*. Science 2010; 328:710-722.
6. Harry M. *Histoire évolutive des hominines - Structure génétique des populations. Génétique moléculaire et évolutive*. Ed Maloine, 2001.
7. Jorde L, Watkins W, Bamshad M, Dixon M, Ricker C, Seielstad M, Batzer M. *The distribution of human genetic diversity: a comparison of mitochondrial, autosomal, and Y-chromosome data*. Am J Hum Genet 2000; 66:979-988.
8. Jorde LB, Wooding SP. *Genetic variation, classification and „race"*. Nat Genet 2004; 36:S28-33.
9. Laland KN, Odling-Smee J, Myles S. *How culture shaped the human genome: bringing genetics and the human sciences together*. Nature Rev Genetics 2010; 11:137-148.
10. Maliţa M. *Cumințenia pământului*. Ed. Corint, București, 2010.
11. Newbury DF, Fisher SE, Monaco AP. *Recent advances in genetics of language impairment*. Genome Medicine 2010; 2:6, 1-6.
12. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HE. *Thompson&Thompson Genetics in Medicine*, ed. a VI-a. WB Saunders Company, 2001, 79-109.
13. Rimoin DL, Connor MJ *et al. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. ed. a V-a. Churchill Livingstone Elsevier, 2007, vol. 1, 307-318.
14. Speicher MR, Antonarakis SE, Motulsky AG. *Vogel and Motulsky's Human Genetics*. ed. a IV-a. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2010, 529-555.
15. Wang X, Grus WE, Zhang J. *Gene losses during human origins*. PLoS Biol 2006; 4:e52. PMID 16464126.
16. Wells S. *Omul – o aventură genetică*. Ed. CD Press, București, 2009.
17. Chimpanzee Sequencing & Analysis Consortium. *Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome*. Nature 2005; 437:69-87.

BCU "CAROL I" CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

Capitolul 9

BOLILE GENETICE ŞI MEDICINA GENOMICĂ

În ultimele 3-4 decenii, medicina a făcut progrese teoretice şi practice remarcabile, la care genetica umană şi-a adus o contribuţie importantă. Genetica a demonstrat *unicitatea biologică* a fiecărei fiinţe umane, precum şi rolul major al factorilor genetici în edificarea structurilor şi desfăşurarea funcţiilor organismului. A devenit evident că *mutaţiile sunt o cauză majoră de boală sau predispoziţie la îmbolnăvire*, iar ponderea afecţiunilor genetice se află într-o continuă creştere. Elucidarea mecanismelor moleculare ale bolilor, inclusiv ale bolilor comune ale adultului, a generat *noi metode de diagnostic şi tratament* care se adresează moleculelor implicate în procesele patologice; medicina clasică a devenit astfel o *medicină moleculară*. Există însă o interacţiune permanentă între factorii de mediu şi factorii genetici, demonstrată în special de variaţiile individuale, determinate de structura genetică, sub acţiunea factorilor externi – studiate de *ecogenetică şi farmacogenetică*.

Genetica medicală *a devenit o specialitate clinică distinctă*, preocupată de diagnosticul, explorarea şi îngrijirea pacienţilor şi familiilor cu afecţiuni genetice, care afectează orice organ, la orice vârstă. Prin dezvoltarea testelor genetice, a sfatului genetic, introducerea unor programe de depistare în diferite grupuri populaţionale (prenatal, neonatal sau postnatal) şi a diagnosticului prenatal, genetica medicală contribuie decisiv la profilaxia bolilor genetice. Majoritatea bolile genetice sunt boli rare (cu o prevalenţă mai mică de 1:2.000) dar, fiind numeroase, ele afectează în ansamblul lor 5-8% nou-născuţi în fiecare an (un total de aproape un milion de persoane în România), fiind *o problemă majoră de sănătate publică*. Cu toate acestea în multe ţări, inclusiv în România, bolile genetice nu reprezintă încă o preocupare suficientă pentru multe din sistemele naţionale de sănătate. De aceea, la 11 noiembrie 2008 Comisia Europeană de sănătate a redactat pentru Parlamentul European raportul *„Bolile rare – o provocare pentru Europa"*, iar la 9 iunie 2009 Consiliul Europei a aprobat recomandarea pentru toate statele membre *„Privind o acţiune europeană în domeniul bolilor rare"*, menită să plaseze corect bolile genetice printre domeniile prioritare de sănătate publică.

Finalizarea Proiectul Genom Uman (2004) – prin determinarea secvenţei nucleotidice complete a ADN nuclear şi identificarea, localizarea şi funcţia genelor ce alcătuiesc genomul uman – reprezintă o etapă fundamentală în progresul medicinii şi cunoaşterea evoluţiei omului, care *inaugurează era genomicii în medicină* şi sănătatea publică. Se trece de la *genetica medicală* – care studiază gene izolate şi efectele lor (boli genetice), la un număr relativ mic de pacienţi – la **medicina genomică** – care studiază funcţia şi interacţiunile *tuturor genelor* din genom asupra fenotipului, precum şi interacţiunile genomului cu mediul şi experienţa personală, la *toţi oamenii*. Medicina genomică reflectă nu numai o modificare cantitativă în abordare (de la o genă unică la multe gene), dar şi o modificare calitativă deoarece dă informaţii privind rolul întregului genom asupra stării de sănătate şi boală. Medicina genomică este o medicină individualizată, în esenţă *predictivă, personalizată şi preventivă*.

A. Interacţiunea dintre ereditate şi mediu în producerea bolilor

1. Starea de sănătate şi cea de boală

Sănătatea şi boala sunt greu de definit, iar explicaţiile acestor „stări de viaţă" sunt complexe; nu există încă, iar după unii probabil nu va exista niciodată, o teorie generală care să le explice.

După OMS, **sănătatea** este *„starea de bine şi de confort fizic şi psihosocial, în absenţa unei boli sau*

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

infirmități manifeste clinic". Într-o accepțiune mai generală, sănătatea reprezintă o relație armonioasă între structurile și funcțiile organismului uman. Acest fapt implică „un echilibru" și „o menținere constantă" a acestora, în condițiile fluctuante ale mediului, deci o adaptare flexibilă și permanentă. Capacitatea organismelor vii de a-și *menține*, prin procese de autoreglare neuro-endocrină complexă, o serie de caracteristici fiziologice *stabile*, îndeosebi la nivelul mediului intern, a fost denumită **homeostazie**.

Conținutul noțiunii de homeostazie a evoluat în timp, s-a îmbogățit (în prezent se vorbește de o reglare programată și una adaptativă) și a căpătat mai multe fațete: pornind de la homeostazia fiziologică (concept introdus de Claude Bernard și dezvoltat de Cannon și Handerson), homeostazia imunologică și apoi homeostazia genetică, s-a ajuns la homeostazia dezvoltării și, mai recent, la homeostazia socială și culturală. Cert este că homeostazia este acum un concept mult mai larg și, evident, un termen de referință pentru noțiunile de sănătate și boală.

Orice alterare majoră a structurii și/sau funcției normale a organismului, deci a stării de sănătate, provocată de cauze exogene sau endogene, reprezintă o *stare patologică sau o* **boală**. Rezultă o serie de manifestări obiective (*semne*) și subiective (*simptome*) ce reflectă natura bolii și reacțiile proprii ale bolnavului. Modificările structurale pot fi consecința unor tulburări de formare (defecte de programare sau defecte de execuție) sau a unor leziuni/distrugeri, prenatale sau postnatale, a unor structuri normal formate. În caz de boală, perturbările funcționale implică depășirea echilibrelor homeostazice (fiziologice, metabolice, imunologice etc.).

Deși variate prin cauze (etiologie), mecanisme de producere (patogenie) și manifestări clinice (semne și simptome), bolile prezintă anumite caracteristici comune.

- *Cauzalitatea*; nu există boală fără cauză (chiar dacă aceasta nu este întotdeauna evidentă, cunoscută). Agenții cauzali sau factorii de boală – determinanți și favorizanți – pot fi exogeni (biologici, chimici, fizici, psihologici, socioeconomici) sau endogeni (genetici). În funcție de numărul factorilor etiologici determinanți se pot deosebi boli monofactoriale (genetice sau ecologice) și multifactoriale (produse de acțiunea combinată, în proporții diferite, a factorilor de mediu și a factorilor genetici).
- *Existența unor reacții de răspuns ale organismului la agresiune*, nespecifice sau specifice, generale și/sau locale (uneori celulare). Aceste reacții se sistematizează în *mecanisme patogenice* de boală ce pot fi: informaționale, neuro-endocrine, biochimice, energetice.
- *Limitarea capacității de adaptare* a organismului la mediul extern sau sociocultural; se realizează astfel „o incapacitate" temporară sau definitivă.

2. Concepțiile despre boală

În decursul timpului s-au confruntat două concepții polare despre boală: una *esențialistă* (promovată de William Osler) și alta *nominală* (susținută de Archibald Garrod, care a introdus conceptele de individualitate biochimică și susceptibilitate individuală). Aceste alternative au influențat profund *gândirea medicală* și evoluția medicinii.

a) Concepția esențialistă

- Fiecare boală este o entitate specifică. Ea apare întâmplător (ca „un simplu fapt de viață", ca „o eroare biologică") la o persoană anterior sănătoasă, are o cauză specifică și se exprimă într-o formă relativ *constantă*, asemănătoare, la diferiți bolnavi. Bolile infecțioase și, paradoxal, bolile monogenice corespund perfect acestui „model".
- Bolnavul este considerat *„o mașină stricată"*, pe care medicul trebuie s-o repare. Or, toate mașinile sunt făcute *după un proiect unic*, deci sunt relativ identice. *Boala este pe primul plan*, nu interesează *cine* este bolnavul (poate fi „oricine") și, evident, de ce s-a îmbolnăvit.
- Medicul are două obiective (misiuni) principale – diagnosticul și tratamentul bolii – ce derivă din întrebările: *„ce are bolnavul?"* și *„cum trebuie tratat?"*. Mentalitatea sa este eminamente inginerească: *„ce pană are mașina și cum s-o repar"*. *Tratamentul este direcționat spre boală* și nu spre pacient, care nu este important în decizia terapeutică, deci tratamentul este relativ identic la toți bolnavii. Este o crudă ironie faptul că medicina, o profesie atât de devotată îngrijirii indivizilor, le acordă, din această perspectivă de abordare, atât de puțină atenție.

b) Concepția nominală

- Descrie boala nu ca pe o entitate, ci ca o *rezultantă* a interacțiunii dintre individualitatea (unicitatea) biologică a pacientului (înțeleasă ca o anumită structură genetică și o experiență de viață particulară) și agenții cauzali din mediu. Originea bolii are rădăcini în natura umanității și istoria genetică și ecologică a fiecărui individ (deci în susceptibilitatea lui specifică la boală, denumită mult timp *constituție* sau *teren*). Devine astfel evident că *„nu există boli, ci numai bolnavi!"*. Eventualele similitudini de manifestare la bolnavi diferiți se

BCU "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA LIBRARY

datorează *fondului comun de gene*. Bolile multifactoriale, ce formează de fapt o mare parte a patologiei umane, corespund perfect acestui „prototip"; să nu uităm însă că apariția și evoluția multor afecțiuni „ecologice" sunt influențate de structura genetică a fiecărui individ (ce determină rezistența sau vulnerabilitatea la agresiune) și nici că expresivitatea variabilă a bolilor genetice poate fi determinată de mediu.

- În concepția „nominală" *individul bolnav este pe primul plan*, el fiind de fapt *un ansamblu unic de gene*, cu o anumită „istorie" (părinți, familie), cu o anumită evoluție în timp, cu „o experiență" unică de viață (trăită într-o serie succesivă de medii specifice lui); el este, în momentul îmbolnăvirii, o persoană mai puțin adaptată la un anumit mediu, un *om vulnerabil*.
- Medicul trebuie, evident, să pună un diagnostic și să trateze. Dar, în contextul individualității bolnavului, el trebuie să răspundă și la întrebările, fundamentale în esența lor, „de ce *acest* pacient (și nu altul) a făcut *această* boală (și nu alta)?", „ce tratament este corespunzător *acestui bolnav*, individualității sale specifice?".

Cele două concepții despre boală prezintă deosebiri fundamentale și este logic să ne întrebăm care dintre ele este valabilă pentru medicina actuală și, prin extensie, pentru învățământul medical.

Este evident că prima, *concepția esențialistă* („osleriană"), bazată pe fapte și acțiuni, a dominat medicina secolului XX și în mare măsură persistă și astăzi, deoarece – chiar dacă ignoră individualitatea pacientului – ea a stat și stă la baza practicii medicale și învățământului „la patul bolnavului". Boala este „*un puzzle*" pe care medicul trebuie să-l rezolve, mobilizându-și simțurile, cunoștințele de patologie și experiența. Pe medic îl interesează mai mult „faptele" (cum să practice medicina), și nu „ideile".

Caracterul tipologic al concepției esențialiste a dus la clasificarea bolilor în funcție de etiologie, organ, vârstă, sex – fapt ce a determinat organizarea actuală a serviciilor medicale. Dezvoltarea tehnologiilor de diagnostic și a metodelor de tratament a crescut eficiența, dar și costurile medicale. Relațiile dintre medic și pacient au pierdut din umanism, întrucât tehnologia care se interpune între medic și bolnav distorsionează modul în care fiecare îl vede pe celălalt. Prevenția rămâne la periferia interesului medicului, iar volumul enorm de date acumulate în ultimul timp – o povară pentru orice minte cuprinzătoare – a dus la fragmentarea medicinii în subspecialități, fără a se găsi o soluție logică de a le menține împreună. Educația medicală pare să sufere o eroziune permanentă prin neadaptarea la evoluția rapidă a medicinii moleculare și lipsa unei strategii, bazată pe o ierarhie de cunoștințe și pe dezvoltarea unei gândiri medicale.

Concepția nominală („garrodiană") se bazează pe concepte, principii și idei care în esență ne învață cum *să gândim* în medicină. Înlocuind metafora „mașinii stricate" cu o concepție etiopatogenică bazată pe individualitatea biologică, socială și istorică, precum și pe homeostazia biologică complexă (genetică, ontogenetică, funcțională, imună, socioculturală), această concepție dezvoltă predicția și prevenția (elementele-cheie ale „medicinii omului sănătos"), umanismul și bioetica.

Există suficiente argumente ca să optăm în medicina actuală pentru concepția nominală, fundamentată prin dezvoltarea geneticii, care a demonstrat unicitatea și diversitatea noastră, precum și existența unei „*homeostazii moleculare*". Dar credem că drumul este lung. Chiar dacă genetica a devenit „*o parolă de acces*" la medicina secolului XXI, există motive să credem că genetica umană a fost mai curând „adaptată" la gândirea medicală existentă decât a contribuit la schimbarea ei. Fiind rezonabili, este poate bine să spunem că adevărul este, ca de obicei, la mijloc și că poate cea mai bună atitudine pentru medicul de astăzi este să aplice idealul concepției esențialiste în domeniul practicii curente și pe cel al concepției nominale în gândirea medicală.

În acest context, **abordarea genetică** a devenit *o nouă dimensiune în relația medic – pacient* (vezi subcapitolul 1.D.3). Ea se bazează pe trei principii majore:

- *unicitatea bio-psiho-socială a fiecărei persoane*, care determină răspunsul specific la agresiuni, predispozițiile individuale la anumite boli, manifestările variabile și gravitatea bolii și răspunsul particular la tratament;
- *natura genetică a bolilor*, în care intervin factori genetici, determinanți sau favorizanți;
- *familia ca unitate de acțiune*, deoarece genele mutante se transmit la alte persoane din familie.

În esență, abordarea genetică în medicina modernă presupune o cultură și o concepție (gândire) genetică, care trebuie însușite.

3. Clasificarea (taxonomia) genetică și genomică a bolilor umane

În ciuda progreselor medicinii, clinicienii continuă să definească o boală pe baza manifestărilor fenotipice. Exceptând bolile infecțioase există încă puține boli care sunt definite pe baza mecanismelor patogenice. Această abordare tradițională subestimează mecanismele de boală și nu permite identificarea

heterogenității clinice, în care boli diferite au o manifestare asemănătoare. Nici clasificarea convențională a bolilor, bazată în special pe disfuncția unui organ sau sistem, nu ține cont de patogenie, iar relația cauză-efect rămâne neclară.

Dezvoltarea geneticii umane și biologiei moleculare a furnizat ample informații care dovedesc că marea majoritate a bolilor umane[1] au o componentă genetică, adeseori semnificativă, iar cunoașterea ei îmbunătățește decisiv patogenia, diagnosticul și opțiunile terapeutice. Această abordare a deschis calea pentru *o nouă taxonomie, genetică și genomică*, a bolilor umane, bazată pe mecanismele moleculare și nu pe criterii secundare/periferice, precum și pentru identificarea unor subtipuri distincte din aceeași boală, diferite patogenic și cu tratamente distincte.

Clasificarea moleculară (genetică și genomică) a bolilor umane nu este încă pe deplin recunoscută de clinicieni; mai mult, diferite categorii de boli genetice sunt considerate rare și incluse într-o categorie mai largă de boli de organ/sistem, fără a fi recunoscute ca o clasă nouă de boli. Progresele taxonomiei genetice sunt îngreunate serios de lipsa unei educații adecvate la toate nivelurile precum și a integrării insuficiente a tehnologiilor genetice moderne în diagnostic și tratament.

În capitolul 1.2 precizam că în funcție de ponderea acțiunii mediului și eredității putem deosebi trei categorii de caractere anormale sau boli:

- caractere determinate de mediu, în care ereditatea imprimă prin mecanismele de apărare imună și metabolizarea diferitelor substanțe (inclusiv medicamente) un mod specific de răspuns la agresiunile mediului;
- caractere determinate de interacțiunea ereditate – mediu sau boli multifactoriale;
- caractere pur ereditare, produse de mutații sau modificări genomice, reprezentate de bolile cromozomiale, bolile monogenice și mitocondriale și bolile genomice.

Pe această bază vom discuta în subcapitolele următoare principalele categorii de boli umane.

B. Ecogenetica și farmacogenetica

Ecogenetica este partea geneticii medicale care studiază *variațiile individuale determinate genetic la acțiunea unor factori din mediu* (Brewer, 1971). Aceste variații produc diferențe de răspuns a organismului uman la anumiți agenți ecologici și deci vulnerabilități diferite la agresiune. Unele persoane vor fi mai susceptibile la îmbolnăvire, iar altele mai rezistente. Substratul genetic al acestei variabilități este reprezentat în primul rând de *polimorfismul genetic* al unor loci care prezintă diferite variante alelice (la mai mult de 1% din populație), unele dintre ele asociindu-se cu un risc crescut de boală. Mai rar, variațiile individuale sunt determinate de anumite mutații genice sau de intervenția unui sistem poligenic cu o distribuție continuă cu prag.

Cea mai dezvoltată parte a ecogeneticii actuale o reprezintă **farmacogenetica**; aceasta studiază *variațiile individuale determinate genetic la acțiunea unor medicamente* (vezi secțiunea următoare).

1. Ecogenetica

În decursul timpului au fost evidențiate multiple variații individuale, determinate genetic, ale răspunsului la agresiunile externe, identificându-se diferite boli produse prin acțiunea combinată a unei susceptibilități genetice și a unei expuneri specifice la anumiți factori din mediu. Tabelul 9.1 sintetizează datele existente pentru cele mai cunoscute „**boli ecogenetice**".

Identificarea susceptibilității la anumite agresiuni din mediu are o valoare practică deosebită pentru profilaxia îmbolnăvirilor. Spre deosebire de măsurile de prevenție clasice, care se adresează unui grup din populație, identificarea persoanelor cu risc de îmbolnăvire – prin cercetarea unor markeri genetici – reprezintă o *profilaxie „individualizată"*, personalizată, ce ar putea fi mult mai eficientă. În acest context, se apreciază că aria ecogeneticii va crește ca importanță în viitor prin cercetarea corelației dintre polimorfismele ADN-ului și riscurile pentru bolile comune ale adultului (în special cancer), ce implică și o expunere a organismului la agenți de mediu.

1.1. Ecogenetica infecțiilor

Infecțiile sunt considerate ca prototip de boli ecologice. Dar, din cele mai vechi timpuri s-a observat că vulnerabilitatea la anumite infecții este diferită la persoane diferite și că manifestările și gravitatea bolilor infecțioase variază în populație. Diferențele individuale

1. Exceptând traumatismele toate bolile umane au o componentă genetică mai mare sau mai mică.

BCUIAȘI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Tabelul 9.1. Variaţii genetice în susceptibilitatea la agenţii din mediu

Agenţi din mediu	Susceptibilitatea genetică	Afecţiuni
Infecţii	Răspuns imunitar redus	– Diferite boli infecţioase – Diabet zaharat ? – Spondilită?
Anumite componente din alimentaţie: – lapte (lactoză) – fructoză – gluten – grăsimi – acid folic – sare – suplimente de fier – oxalaţi – boabe de *Vicia fava* (bob)	 – deficienţă în lactază – deficienţă în fructoz-1-fosfat aldolază – sensibilitate la gluten – hipercolesterolemie – creşterea homocisteinei în sânge datorită polimorfismului MTHFR şi deficienţă în folaţi – deficienţă în folaţi; polimorfismul receptorilor de folaţi sau a MTHFR – deficienţe ale pompei Na-K – hemocromatoză – hiperoxalurie – deficienţă în G6PD	 – intoleranţă la lactoză – intoleranţă la fructoză – boală celiacă – boală coronariană – boală coronariană – defecte de tub neural – hipertensiune arterială – încărcare hepatică – calculi renali – anemie hemolitică (favism)
Alcoolul	– alcooldehidrogenază atipică	– alcoolism
Diferite substanţe chimice – hidrocarburi policiclice (fum de ţigară) – amine industriale – pesticide	– inducţia aril-hidrocarbon-hidroxilazei – acetilatori lenţi – polimorfismul paraoxonazei	– cancer pulmonar – cancer de vezică – accidente după expunerea la organofosfaţi
Unele medicamente	– polimorfisme enzimatice	– „accidente farmacogenetice"
Pulberi ± fum ţigară	– deficienţă în α1-antitripsină	– emfizem pulmonar (BPOC)
Alergeni	– atopie	– astm bronşic
Radiaţii ultraviolete	– scăderea/lipsa melaninei – deficienţa enzimelor de reparare a ADN	– cancer cutanat – xeroderma pigmentosum – cancer cutanat

de susceptibilitate la infecţii erau atât de evidente, încât l-au determinat pe Claude Bernard să afirme – la sfârşitul secolului al XIX-lea, în plină perioadă de „euforie" generată de descoperirile lui Pasteur – că *„microbul nu-i nimic, terenul este totul"*.

Desigur, vulnerabilitatea sau rezistenţa la infecţii sunt multifactoriale; un rol important îl au vârsta, starea de nutriţie, statusul socioeconomic etc., dar elementul major îl reprezintă imunitatea, determinată genetic. În fond, orice infecţie poate fi considerată „un conflict de interese", o confruntare între individualitatea genetică a gazdei, ce produce grade diferite de vulnerabilitate sau rezistenţă, şi individualitatea genetică a bacteriei, ce determină patogenitatea şi virulenţa ei. Există numeroase dovezi despre existenţa unei predispoziţii la infecţii, determinate monogenic (mendelian) sau poligenic. Pe primul plan se situează sindroamele monogenice de imunodeficienţă primară (peste 200; de exemplu, SCID – *severe combined immunodeficiency*) asociate cu infecţii multiple. Urmează predispoziţiile (mai rar rezistenţele) monogenice la o anumită/o singură infecţie (tabel 9.2) şi predispoziţii poligenice (dar cu o genă majoră[2]) sau oligogenice (un exemplu ilustrativ îl reprezintă *predispoziţia genetică la tuberculoză*; caseta 9.1).

Din această perspectivă, infecţiile încetează să fie boli „pur ecologice" şi devin, ca şi alte afecţiuni multifactoriale, rezultanta interacţiunii dintre genotip şi mediu.

Variabilitatea/diversitatea genetică umană a fost un avantaj evident al populaţiilor umane, confruntate cu infecţii devastatoare, care n-au putut fi integral decimate nici de marile epidemii ale Evului Mediu. Dar polimorfismul actual al unor markeri biologici şi predominanţa unor boli genetice în anumite populaţii pot fi corelate într-o oarecare măsură şi cu selecţia naturală produsă de bolile infecţioase. Este bine cunoscut avantajul selectiv (rezistenţa la infestarea cu *Plasmodium falciparum*) al heterozigoţilor pentru diferite gene ale căror mutaţii produc *hemoglobine anormale* (HbS, HbC, talasemie etc.) sau deficienţa în G6PD faţă de malarie; acest mecanism selectiv

2. Vulnerabilitatea la infecţiile cu *Mycobacterium leprae* este dată de două gene majore *PARK2 ŞI PACRG*

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 9.1

Predispoziția genetică la tuberculoză

După cum se știe, tuberculoza este o boală infecțioasă cronică produsă de Mycobacterium tuberculosis și care reprezintă o problemă de sănătate publică, întrucât circa 1/3 din populația globului este infectată cu M. tuberculosis; potrivit OMS, în 1998 s-au înregistrat 8 milioane de cazuri noi de tuberculoză clinică și 1,9 milioane de decese prin tuberculoză. În aceste condiții este normal ca boala și agentul patogen să fie în centrul atenției cercetătorilor.

S-a stabilit că genomul M. tuberculosis (4,5 milioane pb) are circa 4.000 de gene, dintre care aproximativ 90% au funcție cunoscută, codificând învelișul lipidic, factorii de patogenitate (genele mce, sigA, erp etc.), factorii de supraviețuire intracelulară sau de rezistență la anumite medicamente.

Infecția cu M. tuberculosis și tuberculoza clinică rezultă prin interacțiuni complexe între agentul infecțios, factorii de mediu și gazdă; cert este că nu toți indivizii expuși la M. tuberculosis devin infectați, și numai circa 10% din numărul mare de indivizi infectați dezvoltă tuberculoza clinică; există deci o susceptibilitate genetică la această boală.

Studiile privind controlul genetic al imunității antimycobacteriene și al tuberculozei clinice se pot grupa în trei categorii:

- *Asocierea dintre tuberculoză și anumite gene ce codifică proteine implicate în imunitatea antimycobacteriană; studii populaționale, efectuate în diferite țări, au evidențiat asocieri cu: proteina fixatoare de manoză (în India), interleukina-1 beta (în Gujarti), NRAMP1 – proteina macrofagică asociată cu rezistența naturală – (în Gambia), anumite alele HLA clasa II, receptorul vitaminei D. Aceste studii pledează pentru o predispoziție poligenică complexă; alelele implicate au însă un rol funcțional incert și efecte moderate.*
- *Sindromul de susceptibilitate la infecțiile mycobacteriene produs de mutații rare, cu transmitere monogenică, ce produc forme severe de tuberculoză.*
- *Identificarea unor gene majore de susceptibilitate la tuberculoza clinică; recent (Greenwood* et al., *2000) a fost identificată (într-o populație autohtonă din Canada neexpusă anterior la tuberculoză) o genă care determină un risc crescut (×10) de boală. Gena de susceptibilitate a fost localizată în regiunea cromozomială 2q35, în care se află și gena NRAMP1. Nu se știe încă dacă gena de susceptibilitate este NRAMP1 sau o altă genă din imediata apropiere. Gena NRAMP1 este un bun candidat, deoarece omologul ei la șoareci reglează faza inițială a infecției mycobacteriene; la om, această genă ar controla progresia de la starea de infectat (indivizi cu test cutanat pozitiv la tuberculină) la starea de afectat (indivizi cu boală). În alte populații, cu un istoric de expunere intensă la tuberculoză, genotipurile susceptibile au dispărut rapid și probabil alte gene polimorfice, cu efecte medii, pot predispune la îmbolnăvire într-o modalitate mai puțin evidentă.*

Natura susceptibilității genetice la tuberculoză nu este încă elucidată și nu este exclus ca diferite alele ale unei/câtorva gene să fie implicate în toate cele trei situații descrise mai sus. Cercetările având ca obiectiv înțelegerea controlului genetic al imunității antimycobacteriene continuă, deoarece au implicații biologice majore și deschid o nouă cale de a combate tuberculoza: detecția precoce și urmărirea prelungită a indivizilor cu risc crescut și introducerea unor noi terapii (de exemplu, de restaurare a unei deficiențe parțiale a răspunsului imun).

explică frecvența crescută a hemoglobinopatiilor în anumite populații ce trăiesc în zonele (tropicale) în care malaria este endemică (figura 9.1). Intens studiată și ilustrativă pentru selecția naturală produsă de infecții este variația geografică a anumitor *grupe sangvine AB0*: frecvența crescută a grupei 0 în America Centrală și de Sud a fost corelată cu rezistența persoanelor cu această grupă sangvină la sifilis; în schimb frecvența scăzută a persoanelor cu grupă sangvină 0 în Europa a fost pusă pe seama vulnerabilității lor la ciumă și holeră. Predominanța grupei B în Asia Centrală și de Sud s-a explicat prin acțiunea combinată a vulnerabilității persoanelor cu grupa A la variolă și a celor cu grupa 0 la holeră.

1.2. Ecogenetica nutrițională

Cel mai cunoscut exemplu privind diferențele genetice la alimente îl reprezintă absența (la copii) sau reducerea (la adulți) a activității lactazei intestinale care produce **intoleranța la lactoza** din lapte sau din alte produse lactate (OMIM # 150220), manifestată

Tabelul 9.2. Susceptibilitate/rezistenţă la anumite infecţii, determinată monogenic
(adaptat după Alcais *et al.*, 2010)

Agent infecţios	Fenotip clinic	Fenotip imunologic	Gene implicate
Neisseria	Boală invazivă	Deficienţa MAC*	*C5, C6, C7, C8A, C8B, C8G, C9*
	Boală invazivă	Deficienţa în properdină	*PFC*
Mycobacteria	Tuberculoză diseminată	Deficienţă IL-12/23, deficienţă IFN-ă	*IFNGR1, IFGNR2, STAT1, NEMO, ILI2B, ILI2RB1*
Streptococcus pneumoniae	Boală invazivă	Deficienţă IRAK-4	*IRAK4, MYD88*
Virus Epstein-Barr	Boală limfoproliferativă legată de X	Deficienţă de SAP	*SH2D1A, BIRC4*
Virusul Papilloma uman	Epidermodisplazia veruciformă	Deficienţă de EVER1/EVER2	*EVER1, EVER2*
Virusul Herpes simplex 1	Encefalită	Producţie insuficientă de IFN tip 1	*UNC93B1, TLR3*
Tripanosoma evansi	Episoade febrile	Absenţa activităţii tripanolitice	*APOL1*
Plasmodium vivax	Rezistenţă naturală	Absenţa receptorului pentru patogen	*DARC*
Virusul HIV-1	Rezistenţă naturală	Absenţa receptorului pentru patogen	*CCR5*
Norovirus	Rezistenţă naturală	Absenţa receptorului pentru patogen	*FUT2*

* MAC – complexul de atac membranar, format la suprafaţa membranei bacteriene, prin activarea complementului; IL – interleukină; IFN – interferon; IRAK – receptor pentru interleukina 1 asociat kinazei 4; SAP – sapozină; EVER – proteina ce formează un canal transmembranar

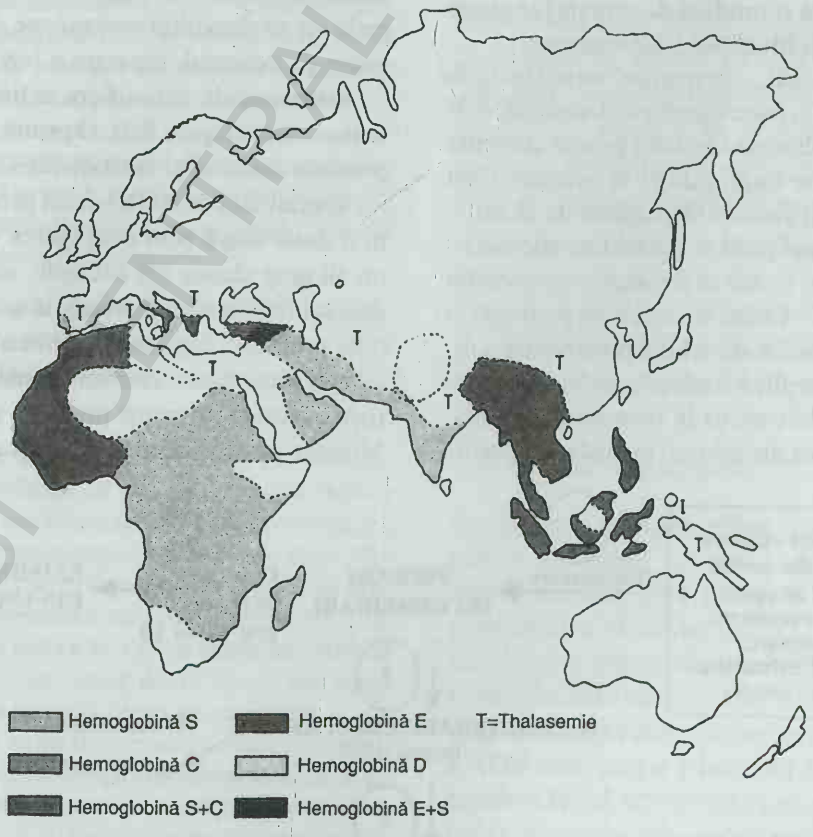


Figura 9.1. Arii geografice în care malaria este endemică, iar sicklemia şi alte hemoglobinopatii sunt frecvente (după Vogel şi Motulsky, 1986)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în special prin diaree severă. În aceeaşi „zonă" se plasează şi **boala celiacă** în care se produce o malabsorbţie a unor alimente datorită sensibilizării la gluten (intoleranţa intestinală la gliadină şi proteinele înrudite prezente în cereale). Alte boli ecologice produse de unele substanţe din alimentaţie sunt menţionate în tabelul 9.1.

Ne vom referi în continuare la variaţii în susceptibilitatea la *boala (ateroscleroza) coronariană* corelate cu alimentaţia. Nivelul colesterolului sangvin depinde de alimentaţie, dar poate fi influenţat şi de mutaţia unor gene, dintre care cea mai frecventă este a genei pentru receptorul LDL ce produce hipercolesterolemia familială (OMIM # 143890) (vezi şi capitolul 12.B.4.1). Recent, un alt factor de risc pentru boala coronariană a început să fie amplu analizat: nivelul sangvin ridicat al aminoacidului homocisteină. Există două erori înnăscute de metabolism ce produc **hiperhomocisteinemie**: *homocistinuria* prin deficienţa în metilen-tetrahidrofolat-reductază (MTHFR) (OMIM # 236250) şi polimorfismul genei ce codifică MTHFR. O anumită variantă alelică (ce codifică o enzimă termolabilă) asociată cu ingestia alimentară redusă de acid folic poate produce creşterea nivelului homocisteinei şi riscul pentru boală coronariană. Mai multe studii au arătat că 17-28% dintre bolnavii coronarieni sunt homozigoţi pentru această alelă. În aceste condiţii devine evident că suplimentarea alimentară cu acid folic (prezent în făină şi produse de cereale) ar putea contribui la scăderea nivelului homocisteinei.

În cadrul ecogeneticii „nutriţionale" se pot include şi variaţiile genetice în metabolizarea *alcoolului*, deşi opiniile privind încadrarea alcoolului printre alimente sau printre droguri se confruntă şi în prezent. Cert este că dependenţa şi consumul exagerat de alcool – **alcoolismul** – are mai mult o cauzalitate socioeconomică. Există totuşi studii ce implică şi intervenţia unor factori genetici. Astfel, enzimele ce participă la metabolizarea hepatică a alcoolului prezintă un polimorfism ce poate explica variaţiile individuale (şi uneori populaţionale/etnice) în răspunsul organismului şi în eliminarea alcoolului, inclusiv în apariţia bolilor legate de alcoolism: ciroza hepatică sau sindromul alcoolismului-fetal (FAS) (vezi capitol 13.B).

Alcoolul este transformat în ficat în aldehidă (sub acţiunea unei alcool-dehidrogenaze, ADH), iar aceasta este apoi degradată prin intervenţia unei aldehid-dehidrogenaze (ALDH). ADH este un dimer realizat prin combinarea a trei tipuri de subunităţi: α – codificată de gena *ADH1A*, β– codificată de gena *ADH1B* şi γ – codificată de gena *ADH1C*; unele combinaţii, în special ale subunităţilor β şi γ, au o eficienţă metabolică mai redusă şi pot duce la o stare toxică la consumul unor cantităţi mici de alcool. Şi ALDH prezintă două variante enzimatice: ALDH1 şi ALDH2. Interesant este faptul că deficienţa de ALDH2 produce chiar la cantităţi mici de alcool o congestie/înroşire facială şi o stare acută de disconfort, inclusiv cefalee. Astfel, indirect, persoanele respective – cu toleranţă mică la alcool – sunt „protejate" faţă de alcoolism.

1.3. Ecogenetica chimică

În cursul vieţii, celulele organismului sunt supuse la o mare varietate de agenţi chimici toxici – de origine endogenă (de exemplu, radicali liberi de oxigen) sau exogenă – care pot interfera cu structura sau metabolismul celular, inclusiv cu genomul. Astfel, se apreciază că 2/3 din cancere sunt produse de agenţi din mediu, în majoritate chimici. În consecinţă, organismele vii au dezvoltat *mecanisme de detoxifiere*, protecţie şi, eventual, reparare a leziunilor.

Sistemele de detoxifiere acţionează, în general, în două faze (figura 9.2). O primă reacţie enzimatică produce *metaboliţi intermediari*, mult mai reactivi (în special faţă de ADN) decât produşii primari, care în a doua etapă prin conjugarea cu glutationul sau un alt grup chimic (de exemplu, acetil) formează produşi solubili ce sunt excretaţi. În această schemă generală, prin care organismul încearcă să neutralizeze efectele unor agenţi chimici din mediu, intervin numeroşi şi variaţi compuşi proteici, codificaţi de gene. Mutaţia acestor gene produce variante alelice care

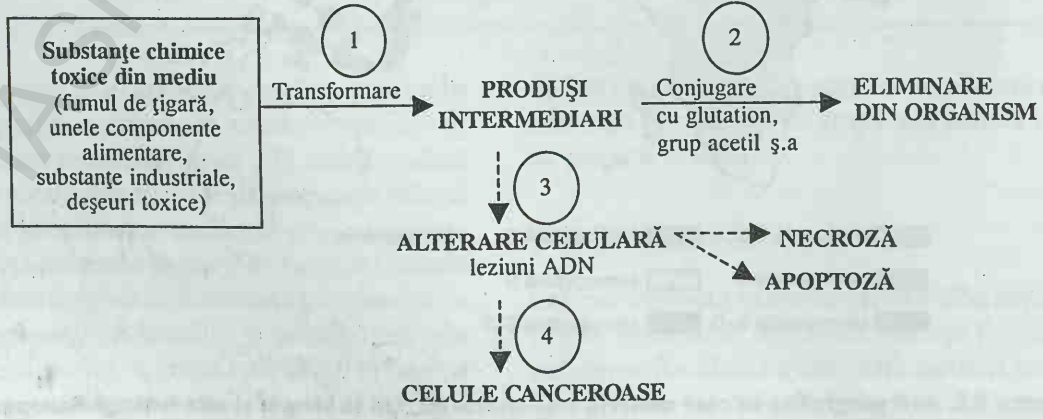


Figura 9.2. Acţiunea în două faze a mecanismelor de detoxifiere

pot determina o susceptibilitate crescută sau rezistență la anumite boli produse de agresiunile chimice, în special cancere. Vom analiza rolul acestor variații individuale determinate genetic în diferite etape ale biotransformării compușilor chimici exogeni.

(1) În procesul de transformare a substanțelor chimice din mediul extern în produși intermediari intervine în special familia proteinelor **citocromului P450** (codificată de genele *CYP*), un veritabil „scut metabolic". Aceste proteine prezintă un polimorfism important ce determină în ultimă instanță un risc crescut sau scăzut la leziuni celulare, inclusiv la nivelul ADN-ului.

- Hidrocarburile policiclice, mai ales din fumul de țigară, induc expresia genei *CYP1A1* care codifică o enzimă – *aril-hidrocarbon-hidroxilaza* – ce produce transformarea lor într-un *epoxid* mai ușor de eliminat din organism, dar mult mai cancerigen. Intensitatea metabolizării hidrocarburilor policiclice este controlată genetic de diferite alele ale genei *CYP1A1*. Alela *„puternic inductibilă"* codifică o variantă enzimatică cu activitate crescută. Fumătorii homozigoți pentru această alelă au un un risc de 7 ori mai mare de a dezvolta cancer pulmonar comparativ cu homozigoții pentru alela *„slab inductibilă"* ce codifică o enzimă puțin eficace în transformarea hidrocarburilor.
- O altă enzimă din familia citocromului P450 este CYP2D6 (codificată de o genă situată pe 22q), implicată în oxidarea unor substanțe (numeroase medicamente, inclusiv beta-blocantul *debrisoquină*, primul studiat). Varianta *„metabolizator lent"* determină o rezistență crescută la efectul potențial cancerigen al fumului de țigară sau al unor cancerigeni industriali (azbest, amine aromatice); în schimb, varianta *„metabolizator intens"* determină un risc crescut (de 18 ori) de cancer pulmonar[3] și de vezică urinară. Aceeași variantă, implicată în detoxifierea neurotoxinelor, se corelează cu un risc crescut pentru boala Parkinson.

(2) Conjugarea produșilor intermediari cu glutationul sau gruparea acetil poate fi redusă la anumite persoane, ducând la acumularea acestor produși înalt reactivi.

- Astfel, variațiile activității *glutation-S-transferazei* (GSTM1) se corelează cu un risc crescut (activitate enzimatică nulă sau scăzută) sau scăzut (protecție) la anumite *cancere*; de exemplu, s-a stabilit că circa 70% dintre bolnavii cu cancer de colon proximal nu au activitate GSTM1. Persoanele care combină genotipul nul pentru *GSTM1* și alela *CYP1A1* cu activitate crescută au un risc relativ de cancer de 30 de ori mai mare decât cei care nu prezintă aceste caracteristici.
- *Acetilatorii lenți* au un risc crescut de cancer vezical, dacă fumează sau sunt expuși la amine aromatice; ei au de asemenea un risc crescut de cancer colo-rectal, dacă în alimentația lor se află produși potențial cancerigeni (rezultați frecvent prin anumite metode de prepararea alimentelor).

(3) *Produșii intermediari intens reactivi* pot produce leziuni ale ADN (mai ales la cei cu deficiențe ale enzimelor de reparare, cum ar fi heterozigoții pentru gena *ATM* sau persoanele cu mutații ale genelor *BRCA1* și *BRCA2*; vezi capitolul 7.B.4), activarea unor oncogene sau mutații ale genei *TP53* ce codifică proteina p53, „gardianul" genomului uman (de exemplu, mutația codonului 249 în cancerul de ficat la subiecții expuși la aflatoxina B1, toxină produsă de ciupercile din genul *Aspergillus*, ce pot contamina unele alimente).

(4) Proliferarea celulelor ce au suferit leziuni genomice este facilitată probabil de anumite deficiențe imunologice, determinate genetic.

Datele prezentate argumentează convingător existența unei susceptibilități diferite la cancerigeni a unor persoane diferite. Deși bazele genetice și biochimice ale vulnerabilității sau rezistenței la cancerele induse de factori din mediu necesită noi cercetări, consecințele benefice pentru sănătatea publică ale identificării persoanelor cu risc crescut sunt evidente.

În contextul ecogeneticii chimice ne vom referi, tangențial, la un subiect deja abordat (vezi capitolul 7.D.1): *polimorfismul alfa$_1$-antitripsinei*. Variantele SS și ZZ, datorită unor substituții de aminoacizi în situsul activ al enzimei, au o activitate antiproteazică redusă la 60% și respectiv 10%, realizând o deficiență de α_1-antitripsină (OMIM # 613490). Această reducere a activității inhibitorilor favorizează acțiunea elastazelor eliberate în procesul inflamator asupra elastinei din pereții alveolelor pulmonare; degradarea elastinei determină emfizem pulmonar. Progresia bolii este mult accelerată la fumători, deoarece fumul de țigară oxidează metionina 358 din situsul activ al enzimei și astfel îi reduce afinitatea pentru elastază de circa 2.000 de ori. Acesta este unul dintre cele mai clare exemple de „boală ecogenetică".

1.4. Ecogenetica fizică

Radiațiile ultraviolete solare reprezintă cauza principală a *cancerului cutanat* la toți indivizii, dar mai ales la cei care au o cantitate redusă de melanină, pigmentul ce absoarbe razele UV. De aceea, persoanele blonde sau cu albinism (OMIM # 203100) au o vulnerabilitate mai mare la cancer cutanat. La acest grup se adaugă cei cu defecte ale enzimelor de reparare a ADN-ului, cum ar fi bolnavii de *xeroderma pigmentosum* (OMIM # 278700) (vezi capitolul 7.B.4). Probabil că studiile viitoare ale polimorfismului normal

3. În unele studii 70-80% din bolnavii cu cancer pulmonar sunt „metabolizatori intenși" (sau oxidatori rapizi) pentru *CYP2D6*.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

al enzimelor de reparare vor aduce date suplimentare pentru identificarea persoanelor vulnerabile la cancere în general şi cancer cutanat în special.

2. Farmacogenetica şi farmacogenomica

Evaluarea efectelor terapeutice ale medicamentelor a permis, în timp, constatarea unor *variaţii în acţiunea* lor la bolnavi diferiţi suferind de aceeaşi boală, precum şi a unor *reacţii adverse*, neaşteptate, care uneori erau fatale. Aceste variaţii individuale pot fi produse de factori multipli – vârstă, sex, boală, interacţiuni medicamentoase etc. –, dar o serie de observaţii clinice au dus la concluzia că factorii genetici (ce produc o „*individualitate biochimică*") influenţează decisiv metabolismul şi deci eficacitatea medicamentului, precum şi producerea unor reacţii adverse. Astfel a apărut conceptul de **farmacogenetică**, definit ca *domeniul de studiu al variaţiilor individuale determinate genetic la acţiunea medicamentelor* (Motulski şi Vogel, 1959).

Farmacogenetica studiază rolul variaţiilor unor gene specifice asupra efectelor medicamentelor. Dar polimorfismele genetice sunt mult mai numeroase şi frecvente în populaţiile umane, astfel că s-a ajuns treptat la o variantă modernă numită **farmacogenomică,** care cercetează rolul întregului genom în metabolizarea şi acţiunea medicamentelor. Dezvoltarea farmacogenomicii, ar putea să permită în viitor – prin folosirea unor teste adecvate – stabilirea medicamentului şi/sau dozei corespunzătoare pentru fiecare pacient sau, pe scurt, *personalizarea medicaţiei*: „medicamentul potrivit pentru pacientul potrivit, la momentul optim".

Orice medicament administrat unui pacient este *absorbit* şi apoi *transportat* şi *distribuit* la situsurile sale de acţiune, unde *va interacţiona* cu ţintele terapeutice, receptori sau enzime; aici va suferi *transformări* în *metaboliţi* (care sunt mai solubili în apă şi mai uşor de eliminat) şi în final va fi *excretat*. Uneori produsul iniţial (pro-medicament) este convertit enzimatic (de obicei în ficat) în compuşi terapeutici activi, iar alteori se pot produce metaboliţi toxici, ce trebuie neutralizaţi. Fiecare dintre aceste procese poate fi potenţial influenţat de variaţii genetice individuale semnificative clinic; ele se grupează în două categorii:

- **variabilitatea farmacocinetică,** care se referă la diferenţele privind absorbţia, activare, rata de metabolizare a medicamentului şi de excreţie a metaboliţilor săi („*ce face organismul cu un medicament*"); aceasta influenţează relaţia doză-concentraţie plasmatică şi relaţia doză-concentraţie tisulară;
- **variabilitatea farmacodinamică,** ce include polimorfismele ţintelor terapeutice: receptori, enzime, canale ionice, transportori („*ce face medicamentul în organism*"); acestea influenţează direct relaţia doză-efect.

La variabilitatea eficacităţii unui medicament se adaugă *reacţiile adverse*, prezente la 1:15 pacienţi internaţi (în Marea Britanie) şi responsabile de 100.000 decese/an (în SUA).

2.1. *Farmacogenetica şi variabilitatea farmacocinetică*

2.1.1. Farmacogenetica enzimelor de metabolizare a medicamentelor

Reacţiile de metabolizare ale medicamentelor sunt tradiţional împărţite[4] în două etape:

- faza I de *biotransformare*, prin reacţii de oxidare, dehidrogenare, hidroliză etc. – produce adesea moleculele active, iar uneori sunt o etapă intermediară de inactivare şi degradare a medicamentului;
- faza II de *conjugare*, prin reacţii de acetilare, glucuronidare, sulfatare, metilare etc. – produc compuşi solubili în apă, mai uşor de excretat.

Enzimele implicate în ambele faze pot avea variante active multiple, ce vor influenţa răspunsul la medicamente („*cât de repede este activat/inactivat şi excretat un medicament*").

Apariţia farmacogeneticii a adus însă în discuţie o problemă deosebit de interesantă: *originea polimorfismelor* ce determină răspunsul variabil la medicamente şi *mecanismul menţinerii lor*, deoarece era evident că ele au apărut înaintea folosirii medicamentelor şi nu „ca răspuns" la utilizarea lor. Deoarece enzimele implicate în biotransformarea medicamentelor participă şi la metabolizarea substanţelor chimice din alimentaţie sau mediu (xenobiotice), se consideră că polimorfismele au apărut în populaţii diferite ca urmare a *presiunii selective alimentare*. Aceasta explică şi frecvenţa lor diferită în grupuri etnice diferite.

a). Farmacogenetica enzimelor fazei I de biotransformare a medicamentelor

Cele mai importante enzime implicate în faza I de metabolizare a medicamentelor (în special în ficat) sunt enzimele din superfamilia **citocromului P450** (CYP450), codificate de 60 de gene, care biotransformă în faza I (prin reacţii de oxidare, hidroliză,

4. Aceste faze nu sunt obligatoriu respectate: faza I poate lipsi uneori sau faza II poate precede faza I.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

dehidrogenare etc.) peste 90% dintre medicamentele prescrise în terapie[5]. Dintre acestea, cele mai studiate au fost **CYP2D6**[6], **CYP2C9** şi **CYP2C19** ale căror polimorfisme genetice au consecinţe funcţionale semnificative asupra activităţii enzimatice, metabolismului hepatic şi efectelor terapeutice ale unui număr mare de medicamente. Pacienţii cu variante alelice ce codifică enzime nefuncţionale sau hipofuncţionale sunt *metabolizatori lenţi (slabi) sau intermediari* şi, datorită creşterii concentraţiei plasmatice a medicamentului (prin diminuarea clearance-ului 7metabolic şi scăderea eliminărilor urinar, vor avea un risc crescut (supradoză) la reacţii adverse. Alţi pacienţi cu alele mutante sau duplicate codifică enzime intens funcţionale şi vor fi *metabolizatori ultrarapizi* la care efectele terapeutice vor fi modeste la dozele standard (figura 9.3).

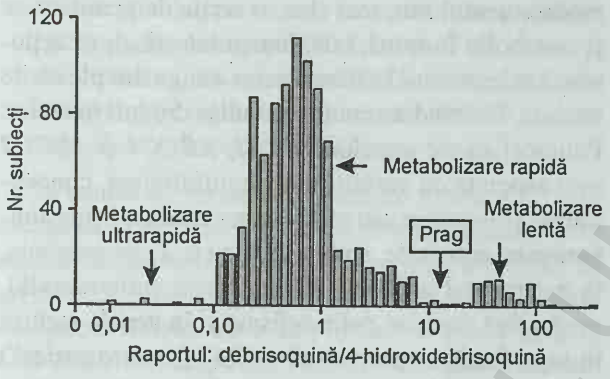


Figura 9.3. Farmacogenetica CYP2D6

Subiecţi cu metabolizare redusă şi cu metabolizare rapidă a debrisoquinei (după Weinshilboum, 2003)

Pentru a atinge concentraţii serice echivalente la pacienţi diferiţi s-a propus un algoritm de ajustarea a dozelor în funcţie de genotipul *CYP2D6*: doza standard = 100 U; metabolizatori lenţi = 60 U; metabolizatori intermediari = 80 U; metabolizatori rapizi 160 U; metabolizatori ultrarapizi = 240 U

- CYP2D6 – este implicată în metabolizarea beta-blocantelor (folosite în tratamentul hipertensiunii arteriale şi a bolilor cardiace) şi a unor antidepresive triciclice (folosite în tratamentul bolilor psihice). CYP2D6 produce conversia codeinei în forma activă cu acţiune morfinică; la metabolizatorii lenţi codeina este ineficace în tratamentul durerilor în timp ce la metabolizatorii ultrarapizi există riscul unor reacţii adverse (sedare, insuficienţă respiratorie).
- CYP2C19 – participă la metabolismul anticonvulsivantelor (mefenitoina), inhibitorilor pompei de protoni (omeprazolul, folosit în tratamentul ulcerului gastric), antiagregantelor plachetare (clopidogrel), unor antidepresive (amitriptilina) sau antimalarice (proguanil).
- CYP2C9 – hidroxilează diferite medicamente larg utilizate: warfarina (un anticoagulant), antiinflamatorii nesteroidiene, inhibitorii enzimei de conversie a angiotensinei (ECA), sau hipoglicemiantele orale (tolbutamida) folosite în tratamentul diabetului zaharat de tip 2.

Deoarece multe din variantele alelice ale *CYP2D6* şi *CYP2C19*, cu relevanţă clinică în biotransformarea medicamentelor, au o frecvenţă mai mare de 5% în cel puţin o populaţie (de exemplu, pentru CYP2D6 – 10% din populaţia caucaziană sunt metabolizatori lenţi, iar 7% metabolizatori ultrarapizi) efectuarea unui screening farmacogenetic este pe deplin justificată.

Având în vedere numărul mare de medicamente tranformate prin oxidare mediată de CYP2D6 s-au elaborat metode pentru determinarea statusului de *metabolizator lent sau metabolizator rapid (intens)* folosind ca „droguri test" *debrisoquina* (un medicament antihipertensiv) şi *sparteina* (un antiaritmic şi ocitocic) (figura 9.3). Din păcate aplicarea lor clinică de rutină s-a dovedit a fi dificilă. Atunci s-a recurs la tehnicile de genetică moleculară care au permis caracterizarea variaţiilor genetice (polimorfisme ADN) responsabile pentru activitatea redusă sau absentă a CYP2D6. Testul farmacogenetic ***AmpliChip CYP450*** (Hoffmann-LaRoche, 2003) este primul test microcip aprobat în SUA şi UE pentru identificarea polimorfismelor genetice esenţiale ale genelor ***CYP2D6*** şi ***CYP2C19***, responsabile de metabolizarea hepatică a numeroase medicamente (beta-blocante, inhibitori pompă protoni, inhibitori ECA, antiagregante plachetare etc.) des utilizate în practica medicală. *AmpliChip CYP450* este util în *predicţia statusului metabolizator* al pacienţilor, înlocuind metoda clasică de definire a acestuia cu ajutorul medicamentelor-test debrisoquină sau sparteină. Din păcate testul necesită un timp de lucru şi nu poate fi aplicat în urgenţă, la patul bolnavului.

În faza I de metabolizare a medicamentelor sunt implicate şi alte enzime. Astfel, *butirilcolinesteraza* (sau pseudocolinesteraza) metabolizează succinilcolina (suxametoniu) un miorelaxant folosit în chirurgie. Unele persoane (1:3.500) au o enzimă atipică care produce apnee prelungită (reacţie adversă care necesită ventilaţie artificială). *Dihidropirimidin dehidrogenaza* metabolizează fluorouracilul, un medicament antineoplazic, care în dozele standard poate produce la unii pacienţi metabolizatori lenţi accidente fatale.

b). Farmacogenetica enzimelor fazei II de metabolizare a medicamentelor

În faza a doua de metabolizare a medicamentelor au loc reacţii de conjugare (cum ar fi acetilare,

5. Un anumit medicament poate fi metabolizat de o anumită enzimă sau de mai multe enzime CYP450.
6. CYP2D6 – familia citocromului P450, subfamilia D, polipeptidul 6

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

glucuronidare, sulfatare sau metilare) ce produc compuşi solubili în apă, mai uşor de excretat. Persoanele cu deficienţe ale enzimelor implicate în această fază inactivează şi excretă mai lent o serie de medicamente importante.

Polimorfismul acetilării a fost identificat prima dată la bolnavii cu tuberculoză trataţi cu *isoniazidă* (figura 9.4). Acetilatorii lenţi, homozigoţi pentru o alelă *NAT2* (ce codifică *N*-acetiltransferaza) deficientă (prevalenţa 52% caucazieni), au o concentraţie plasmatică crescută a medicamentului, la o terapie standard şi dezvoltă o neuropatie periferică, toxică. De asemenea, acetilatorii lenţi expuşi la *arilamine cancerigene* (de exemplu, benzidina) au o incidenţă crescută a cancerului de vezică urinară, iar femeile la postmenopauză fumătoare au un risc crescut de cancer de sân. Acetilatorii rapizi au frecvent eşecuri ale terapiei cu isoniazidă administrată o dată pe săptămână. Dacă sunt hipertensivi necesită o doză mai mare de hidralazină pentru controlul tensiunii arteriale.

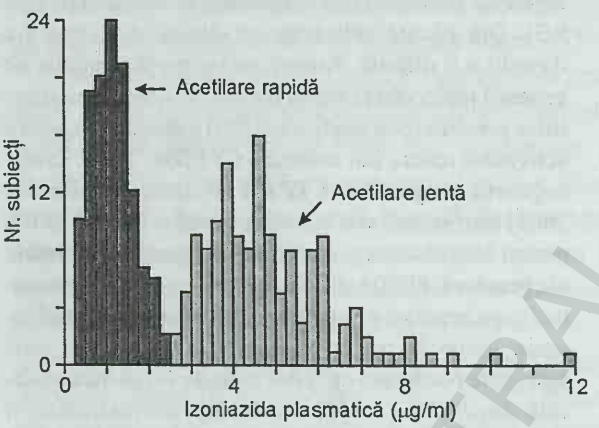


Figura 9.4. Distribuţia bimodală a ratei de acetilare a isoniazidei
(după Weinsihilboum, 2003)

Un alt exemplu îl reprezintă *metilarea tiopurinelor* (mercaptopurina şi azatioprina) – antimetaboliţi folosiţi în clinică ca imunosupresoare şi pentru tratamentul unor neoplazii. Metilarea este produsă de către enzima *tiopurin S-metiltransferază* (TMTP). Pe baza nivelului de activitate a TMTP în hematii, populaţia poate fi divizată în trei grupe – cu metabolizare lentă, medie, rapidă. La dozele standard de tiopurine persoanele cu activitate TMTP lentă au o concentraţie crescută de metabolit activ şi un risc important de mielosupresie fatală; la persoanele cu activitate TMTP rapidă eficacitatea tiopurinelor este redusă, deoarece drogul este metabolizat rapid. Astăzi există posibilitatea testării efectului farmacogenetic al TMTP şi individualizării terapiei pe această bază.

Polimorfismul genei UDP-glucuroniltransferazei UGT1A1 se corelează cu variaţii individuale la tratamentul cu pro-medicamentul antitumoral *Irinotecan* sau la terapia cu *Ritonavir* (inhibitor al HIV1 proteazei); varianta alelică **28* determină reducerea cu 30% a capacităţii de conjugare prin glucuronidare, acumularea medicamentului şi reacţii adverse icterice (sindrom Gilbert).

2.1.2. Farmacogenetica transportorilor membranari ai medicamentelor

Proteinele de transport au un rol important în absorbţia, distribuţia şi excreţia multor medicamente. Cel mai intens studiate sunt proteinele din familia transportorilor membranari-fixatori de ATP (numiţi şi transportori ABC) şi în special *glicoprotein P*, codificată de gena *ABCB1* (numită şi *MDR1* – de la *Multiple Drug Resistance*). Funcţia principală a glicoproteinei P este efluxul celular de substraturi (şi deci de numeroase medicamente) sau, mai clar, excreţia de xenobiotice şi metaboliţi în urină, bilă, lumen intestinal; ea acţionează şi la nivelul barierei creier-sânge din plexurile coroide, limitând acumularea multor droguri în creier. Polimorfismele genelor *ABCB1, ABCC1* şi *ABCC2* sunt asociate cu variaţii în disponibilitatea, concentraţiile plasmatice sau efectul unor medicamente antitumorale, antivirale, antiepileptice etc. (spre exemplu, în tratamentul epilepsiei sau în terapia antitumorală).

Au fost descrise polimorfisme şi în genele incluse în superfamilia transportorilor SLC („*solute carier*") implicate în absorbţia unor medicamente: statine, rifampicină, enalapril etc.

2.2. Farmacogenetica şi variabilitatea farmacodinamică

Variaţiile genetice individuale în răspunsul la medicamente pot fi determinate nu numai de diferenţe farmacocinetice (în absorbţia, activarea, rata de metabolizare a medicamentului şi de excreţie a metaboliţilor săi) ce influenţează relaţia doză-concentraţie plasmatică ci şi de **variabilitatea farmacodinamică,** ce include polimorfismele ţintelor terapeutice: receptori, enzime, canale ionice, elemente ale căilor de transducţie ale semnalelor („*ce face medicamentul în organism*"); acestea influenţează direct relaţia doză-efect.

a). Polimorfisme genetice ale ţintelor terapeutice cu relevanţă clinică

Variaţiile genetice în ţintele de acţiune ale medicamentelor (de exemplu, receptorii, anumite enzime) pot avea un efect important asupra eficacităţii lor.

- *Variante ale receptorilor beta-adrenergici.* Receptorii beta-2 adrenergici (codificaţi de gena *ADRB2*) sunt ţinta multor medicamente. De

exemplu, agoniştii beta-2 sunt utilizaţi în tratarea astmului bronşic pentru acţiunea lor bronhodilatatoare; efectul lor poate fi diferit la persoane cu variante ale receptorului. Receptorii beta-1 adrenergici (codificaţi de gena *ADRB1*) sunt ţinta altor medicamente, în special beta-blocantele, folosite în boli cardiovasculare; unele variante se asociază cu un răspuns scăzut la dozele standard, iar altele cu un răspuns mai bun.

- *Variaţii în receptorul 2A pentru serotonină* (HT2RA) influenţează răspunsul la medicamentele antipsihotice.
- *Variante ale enzimei de conversie a angiotensinei (ECA).* ECA converteşte angiotensina I în angiotensină II, un reglator important al tensiunii arteriale şi altor funcţii. Inhibitorii ECA (enalaprilul, captoprilul) sunt larg folosiţi în tratamentul insuficienţei cardiace. Gena *ACE* prezintă un polimorfism de tip inserţie/deleţie asociat cu variaţii ale activităţii enzimei: homozigoţii DD (deleţie)[7] au un nivel de două ori mai mare al ECA comparativ cu homozigoţii II (inserţie), iar inhibitorii ECA sunt mai eficace la pacienţii DD.

În contextul variabilităţii ţintelor terapeutice vom menţiona că progresele geneticii au permis proiectarea unor medicamente pentru tratamentul bolnavilor cu un anumit genotip. Astfel circa 30% din bolnavele cu cancer de sân au o amplificare a genei *ERBB2* care codifică receptorul HER2. La aceste paciente, cu hieprexpresie a receptorului HER2, administrarea de *hercetpin* (trastuzumab), un anticorp monoclonal hibrid cu fixare specifică pe acest receptor, are rezultate foarte bune. Deoarece tratamentul este foarte scump s-au pus la punct teste pentru identificarea acestui grup de tumori. Herceptestul (bazat pe PCR pentru gena *ERBB2*) detectează hiperexpresia receptorului, ceea ce permite alegerea pacientelor la care acest tratament este benefic. Un alt exemplu este reprezentat de inhibitorii receptorului EGF (gefitinib, erlotinib) care acţionează eficace la 10% din pacienţii cu cancer pulmonar fără celule mici şi au anumite mutaţii în gena *EGFR.*

b). Polimorfisme genetice cu efecte indirecte asupra răspunsului la medicamente

Polimorfismul unor gene ce codifică proteine care nu sunt implicate în biotransformarea medicamentelor şi nici în ţintele directe ale acţiunii lor – pot influenţa răspunsul la tratament:

- Diferenţe individuale în acţiunea *factorilor de coagulare* (protrombina, factorul V) pot predispune femeile ce iau contraceptive orale la tromboze venoase (ale venelor profunde sau venelor cerebrale);
- Mutaţii ale genei *RYR1* ce codifică receptorul rianodină, un canal de eliminare a ionului de calciu din reticulul endoplasmatic pot determina o reacţie adversă gravă la inhalarea *anesteziceloor volatile* halotan sau izofluran, caracterizată prin rabdomioliză şi creşterea extremă a temperaturii. Această afecţiune denumită *hipertermie malignă* este produsă, în unele cazuri, de mutaţii în gena *RYR1* ce determină un eflux excesiv de calciu.
- Polimorfismul genelor pentru *proteinele de transfer ale esterilor de colesterol* (CETP) poate influenţa progresia aterosclerozei sub terapia cu *statine.* Pacienţii cu alelele *B1B1* ale genei *CETP* răspund mai bine la tratamentul cu statine (Pravastatin), comparativ cu purtătorii de alele *B2B2* care pot fi clasaţi drept non-responsivi;
- Variaţii genetice în *transportorii celulari de sodiu şi potasiu* (de exemplu, gena *KCNE2* ce codifică o subunitate a canalului de potasiu) pot avea un rol predispozant la efectele toxice (aritmii grave) ale unor medicamente ca trimetoprin-sulfametoxazol, claritromicină, ce induc la anumiţi pacienţi un sindrom QT-lung;
- Polimorfismul genei *apolipoproteinei E* (*APOE*) pare a influenţa răspunsul la terapia pentru boala Alzheimer precum şi la medicamentele hipolipemiante din clasa inhibitorilor hidroxi-metil-glutaril reductazei (statine). Astfel pacienţii cu boală Alzheimer care au alela APOE4 (circa 40%) au răspuns redus la tratamentul cu inhibitori de acetilcolinesterază (tacrină); pacienţii cu alela APOE2 au o diminuare mai importantă a fracţiunii LDL-colesterol după terapia cu statine în doze mari (Atorvastatin, Simvastatin, Pravastatin).

2.3. *Farmacogenomica*

Spre deosebire de farmacogenetică care studiază rolul unor *gene individuale* şi ale variaţiilor lor alelice asupra farmacocineticii şi farmacodinamicii unui/unor medicamente, framacogenomica studiază impactul variaţiilor *întregului genom* al unei persoane (deci a unui număr mare de loci polimorfici) asupra efectelor terapeutice ale unui medicament.

Abordarea farmacogenomică a devenit necesară, deoarece efectele multor medicamente sunt determinate poligenic (fiind metabolizate prin intervenţia mai multor enzime), şi posibilă, prin folosirea tehnicilor moderne de analiză genotipică cu ajutorul microreţelelor[8] (vezi capitolul 5).

7. Homozigoţii DD au un risc crescut de boală coronariană şi infarct miocardic acut, dar un risc scăzut de boală Alzheimer.
8. Într-o singură probă se va putea evalua polimorfismul a 20.000 SNPs din 5.000 de gene pentru determinanţii principali ce influenţează distribuţia şi efectele medicamentelor.

Un exemplu elocvent îl reprezintă *warfarina*, un anticoagulant cumarinic folosit frecvent la bolnavii cu risc de embolii sau tromboze. Warfarina acționează prin scăderea disponbilității de vitamină K, cofactor esențial pentru enzima gama-glutamil carboxilază, care activează factorii coagulării II (protrombina), VII, IX şi X. În aceste reacții vitamina K este transformată într-un epoxid inactiv care este reciclat în vitamină K activă de către vitamina K epoxid reductaza (VKOR). Warfarina inhibă VKOR şi astfel reduce nivelul de vitamină K. Realizarea unui nivel optim de anticoagulare este foarte importantă deoarece dozele prea mici mențin riscul de embolii/tromboze, iar dozele prea mari au risc de hemoragii. Terapia cu warfarină este dificilă din cauza indexului (ferestrei) terapeutice înguste şi, mai ales, datorită variabilității de răspuns a pacienților, determinat de polimorfismele genelor (peste 30) ce influențează atât metabolismul (*CYP2C9, CUP 1A2, CYP3A4, CYP2C19 ş.a.*), cât şi ținta farmacodinamică (*VKORC1*). Prospectul medicamentului recomandă genotiparea locilor *CYP2C9* şi *VKORC1* (cu Roche AmpliChip), dar mulți clinicieni sunt sceptici în ceea ce priveşte acest test deoarece el nu este complet predictiv şi se aşteaptă un test simplu, uşor/rapid de efectuat la patul bolnavului şi cu o predicție precisă.

Aplicarea farmacogenomicii nu necesită cunoştințe specifice despre metabolismul medicamentelor sau modul în care diferite alele influențează răspunsul la medicamente. Prin analiza întregului genom se determină *un profil genotipic* (ce vizează fie variații structurale ale ADN, fie expresia genică) cu o valoare predictivă pozitivă suficientă pentru a stabili eficacitatea/toxicitatea unui medicament sau asociații medicamentoase. Apoi se analizează profilul genotipic al pacientului înainte de începerea tratamentului şi în funcție de structura sa genetică se alege medicamentul şi doza eficace pentru a asigura eficacitatea maximă cu minimum de reacții adverse. Această *medicație personalizată* poate fi definită prin sintagma „*medicamentul potrivit pentru pacientul potrivit, la momentul optim*".

Exemplul cel mai sugestiv de tratament personalizat este determinarea (cu ajutorul microrețelelor ARN) profilului de expresie genică („*semnătura genică*") în diferite tumori (cancer de sân, leucemii), pentru stabilirea genelor care sunt active şi inactive în țesuturile tumorale comparativ cu țesuturile normale şi identificarea unui subgrup de tumori care au un pronostic mai bun sau răspund mai bine la un anumit tratament. De exemplu, *MammaPrint system* poate ghida tratamentul în cancerul de sân pe baza nivelului de expresie a 70 de gene; există însă critici şi rezerve pentru aplicarea clinică a profilurilor de expresie tumorală, dar foarte probabil viitorul va impune astfel de teste.

Farmacogenomica deschide perspectiva personalizării terapiei şi renunțării la regimurile terapeutice actuale bazate pe prescrierea aceleiaşi doze la toți pacienții („*one dose fits all*") care sunt păgubitoare atât pentru bolnav (eficacitate de doar 25-60% din toate cazurile tratate; peste 3 milioane prescripții anual ineficiente în SUA), cât şi pentru costurile serviciilor de sănătate confruntate cu reacțiile adverse. Promisiunea farmacogenomicii de individualizare a terapiei nu vizează în mod specific un anumit pacient sau pe fiecare pacient, ci urmăreşte mai curând să genereze un ghid de terapie personalizată, cu predictibilitate înaltă ca răspuns la tratament (nivele maxime ale eficacității şi minime ale toxicității), pentru un segment omogen genotipic şi cât mai cuprinzător în raport cu populația potențialilor pacienți (*stratificarea pacienților*).

Farmacogenomica va revoluționa şi industria farmaceutică. Modelul „blockbuster" („popular") promovat până acum de industria farmaceutică, prin care un singur medicament era eficient întregii populații de pacienți diagnosticați cu aceeaşi afecțiune, se apropie de sfârşit, deoarece genomica, prin identificarea biomarkerilor genetici de predicție a răspunsului individual la tratament, va permite practicarea medicinii personalizate. Farmacogenomica este din ce în ce mai mult implicată în toate etapele de design şi dezvoltare a noilor candidați terapeutici.

Nu înseamnă totuşi că farmacogenomica va revoluționa medicina peste noapte, deoarece translația rezultatelor din cercetare în medicina clinică este dificilă, de durată şi scumpă. Costurile actuale pentru asemenea „screeninguri farmacogenomice" sunt mari, dar cu siguranță tehnologia microrețelelor ADN („*microarray*") se va dezvolta, iar beneficiile reducerii frecvenței răspunsurilor adverse şi ale creşterii eficenței terapeutice vor justifica investițiile. „Medicina predictivă şi individualizată", personalizată în funcție de genotipul individului afectat şi tratat, este realmente posibilă, dar într-un viitor apropiat.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

C. Bolile genetice

Recunoaşterea rolului factorilor genetici în cauzalitatea bolilor umane a determinat clasificarea lor în trei mari categorii: *boli ecologice* – negenetice (produse de factorii din mediul extern), *boli multifactoriale* (produse de acţiunea combinată a factorilor de mediu şi a factorilor genetici) şi *boli genetice* (determinate predominant de mutaţii). În secţiunile precedente ale acestui capitol am argumentat faptul că, în afară de traumatisme, termenul „negenetic" poate fi impropriu, căci este greu de conceput că o boală poate fi integral negenetică. Factorii genetici sunt prezenţi de la concepţie, iar dezvoltarea unui individ depinde de interacţiunea factorilor genetici şi de mediu. De aceea, orice variaţie umană, atât în starea de sănătate, cât şi de boală, implică acţiunea într-o anumită proporţie a factorilor genetici. Astfel, chiar în bolile bine definite ecologic (de exemplu, infecţiile), factorii genetici pot juca un rol critic. Se poate deci afirma că *aproape toate bolile umane au o componentă genetică* mai mare sau mai mică. În aceste condiţii, se pune firesc întrebarea: ce sunt de fapt bolile genetice?

Termenul **boli genetice** este rezervat cu precădere afecţiunilor *determinate* de mutaţii genice şi anomalii cromozomiale, dar genetica medicală include în sfera sa de acţiune şi *bolile multifactoriale*, condiţionate genetic sau cu predispoziţie genetică, mai ales acelea în care factorii genetici au o contribuţie (exprimată prin *heritabilitate*) mai mare de 50% (majoritatea malformaţiilor izolate, bolile comune ale adultului şi numeroase forme de cancer). Indiferent de terminologie şi încadrare, se poate afirma justificat că *mutaţiile reprezintă o cauză majoră de boală* sau *predispoziţie la boală*.

Genetica umană a dobândit, într-un timp relativ scurt, un rol din ce în ce mai important în practica medicinii clinice, fiind o componentă centrală a înţelegerii celor mai multe boli majore (de la bolile copilăriei până la bolile comune ale adultului), a diagnosticului şi profilaxiei lor.

1. Clasificarea bolilor genetice

În funcţie de tipul de modificări genetice, de localizarea şi acţiunea lor, se pot deosebi cinci categorii de boli genetice: boli cromozomiale, boli monogenice (mendeliene sau moleculare), boli mitocondriale, boli multifactoriale şi boli ale genomului celulelor somatice.

Aceasta este o clasificare „practică", dar de etapă, deoarece, aşa cum vom vedea, diferenţele dintre aceste categorii tind să se estompeze, iar identificarea unor mecanisme genetice noi va duce, probabil, la noi clasificări. În acest sens vom reaminti (vezi capitolul 7.B.1.3) grupul de *boli genomice* produse prin recombinarea omoloagă nealelică între diferite regiuni din genom, determinată de „arhitectura" lui specifică; în funcţie de mărimea segmentului genomic implicat, se poate produce: fie o boală monogenică, fie un sindrom al genelor contigue sau o aberaţie cromozomială.

1.1. Bolile cromozomiale

Bolile cromozomiale sunt produse de modificări în numărul şi structura cromozomilor, *„vizibile la microscop"* (inclusiv prin tehnicile de FISH; vezi capitolul 2.C.3.2). Această ultimă precizare exclude deleţiile/duplicaţiile genice identificate numai prin tehnicile de analiză moleculară. Oricum, sindroamele produse de microdeleţii sau microduplicaţii de circa 4 Mb se găsesc *la limita* dintre bolile cromozomiale şi bolile moleculare.

Frecvenţa anomaliilor cromozomiale, estimată (cu tehnicile clasice) prin studii sistematice la nou-născuţi vii, este în jur de 6‰. Această valoare este, evident, o subestimare a frecvenţei reale şi, pe baza datelor obţinute cu tehnicile de marcaj în benzi şi FISH, se apreciază că frecvenţa reală este de circa 9-10‰ nou-născuţi vii (vezi capitolul 7.C.3); anomaliile neechilibrate vor produce *sindroame plurimalformative* (peste 600 de entităţi în catalogul editat de Schinzel, 1984), iar cele echilibrate, deşi nu modifică fenotipul pacientului, pot genera *tulburări de reproducere*. Aceste cifre reprezintă doar „partea vizibilă" a icebergului, deoarece, aşa cum am arătat deja (vezi tabelul 7.6), mulţi embrioni cu anomalii cromozomiale se elimină precoce în viaţa intrauterină.

Oricum, aberaţiile cromozomiale sunt principalele cauze ale anomaliilor congenitale multiple, retardului mental, tulburărilor pubertare sau de reproducere (sterilitate, avorturi spontane, nou-născuţi morţi). Cele mai frecvente boli cromozomiale vor fi descrise în capitolul 11.

1.2. Bolile monogenice

Bolile monogenice sunt produse de *mutaţia unei singure gene* (din genomul nuclear) *cu efect major*, care codifică o proteină de structură sau o enzimă. Aceste mutaţii se *transmit în succesiunea generaţiilor după tipul mendelian*: autozomal dominant, autozomal recesiv sau legat de X; de aceea mai sunt numite *boli mendeliene* şi sunt repertoriate în catalogul

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

Mendelian Inheritance of Man, editat (din 1966) de Victor McKusick (ediția nr. 12, 1998; *OMIM* – versiunea online) (vezi caseta 6.4). Dintre cele peste 20.000 de caractere mendeliene, normale sau patologice listate în OMIM, aproape 13.000 reprezintă *boli monogenice* care realizează o frecvență globală estimată inițial la 10‰ nou-născuți (Carter, 1977); incidența reală, actuală, este foarte probabil dublă (20-24‰), dar există motive să apreciem că aceasta va crește o dată cu identificarea unor noi mutații genice. În circa 40% dintre bolile monogenice a fost localizată (deseori clonată) gena implicată și se cunoaște defectul primar, proteina anormală; pentru aceste afecțiuni se folosește deseori, în practică, termenul de *boli moleculare*. Bolile monogenice mendeliene mai frecvente vor fi prezentate în capitolul 12.

1.3. Bolile mitocondriale

Bolile mitocondriale sunt un tip particular de boli monogenice produse de mutații în *genomul mitocondrial* care afectează producerea de energie în mușchi și nervi; ele au un rol important în îmbătrânirea celulară. Se cunosc până în prezent 65 de boli mitocondriale, în majoritatea lor rare, dar probabil că mutațiile genomului mitocondrial sunt implicate într-un mod mult mai complex în patologia umană (vezi capitolul 13).

1.4. Bolile multifactoriale

Bolile multifactoriale pot avea o *distribuție familială*, dar NU se transmit mendelian. Această caracteristică demonstrează intervenția unor factori ereditari (reprezentați de obicei prin mai multe gene – poligenie) care interacționează permanent și complex cu factorii de mediu pentru a produce starea de boală. De cele mai multe ori, factorii genetici realizează o *predispoziție genetică*, o vulnerabilitate individuală la îmbolnăvire. Bineînțeles, nu toți indivizii predispuși se îmbolnăvesc, deoarece vulnerabilitatea se distribuie în populație sub forma curbei Gauss și este necesară intervenția factorilor de mediu care atunci când depășesc un anumit prag transformă predispoziția în boală (vezi capitolul 6.E.2 – modelul distribuției continue cu prag).

Progrese recente în studiul unor boli multifactoriale pledează pentru existența unui model alternativ, mixt, în care factorii genetici sunt reprezentați de o componentă monogenică majoră (una sau două gene importante în patogenia bolii, cu mai multe alele cu acțiune/eficiență variabilă) și o componentă poligenică minoră care interacționează cu factori de mediu și împreună modulează efectul genei/genelor majore.

Teoria oligogenică ar reprezenta de fapt o piesă a spectrului complex al determinismului bolilor umane, ilustrat în figura 9.5, care face tranziția dintre bolile monogenice și cele poligenice. Această teorie deschide o perspectivă optimistă pentru identificarea genelor de predispoziție, depistarea indivizilor predispuși genetic și descoperirea agenților de mediu decisivi pentru o boală. Paradoxal, unul dintre cele mai importante beneficii ale identificării genelor de susceptibilitate la boală nu este potențial util pentru terapia genică, ci mai curând pentru oportunități de tratament și prevenție a bolilor prin intermediul manipulării mediului în care anumiți indivizi dezvoltă un risc genetic.

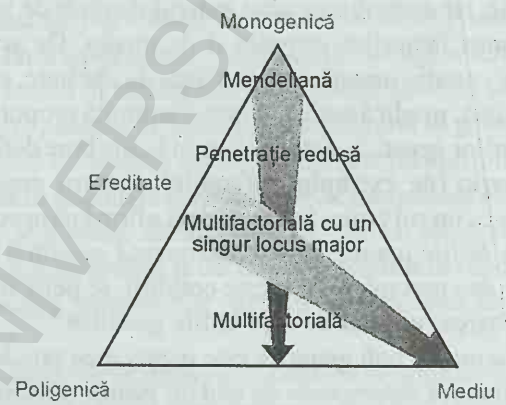


Figura 9.5. Spectrul cauzal al caracterelor umane
(după Strachan și Read, 2001)

Puține caractere sunt pur monogenice, pur poligenice sau pur ecologice; cele mai multe caractere depind de acțiunea combinată a celor trei determinanți.

Vom încheia această prezentare subliniind că bolile multifactoriale (vezi capitolul 14) nu sunt numai complexe, ci și relativ frecvente: malformațiile congenitale și bolile psihice la copil au o incidență de 20-30‰, iar bolile comune ale adultului au o frecvență de două ori mai mare; per total, incidența bolilor multifactoriale depășește 50‰.

1.5. Bolile prin mutații somatice

Bolile prin mutații somatice rezultă prin efectul cumulativ al unor *mutații somatice succesive, în gene diferite*, unele produse prin erori de replicare a ADN, iar altele de către factori de mediu. În această categorie se includ marea majoritate a cancerelor, multe boli autoimune, precum și procesul de îmbătrânire. Bolile se produc *după concepție*, sunt *limitate la celulele somatice* și deci *NU se transmit la descendenți*. Într-un procent mic de cazuri, o mutație inițială (importantă, dar nu suficientă pentru producerea bolii) se poate moșteni de la unul dintre părinți, producând o predispoziție genetică la boală (de exemplu, mutația genei

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BRCA1 în cancerul de sân familial). Frecvența acestei categorii de boli este estimată la circa un sfert din populația adultă (vezi tabelul 1.2).

2. Bolile genomice

Bolile genomice sunt afecțiuni care se produc prin *rearanjarea și modificarea structurii* genomului uman, determinate de anumite *caracteristici arhitecturale* ale genomului; prin aceasta ele se deosebesc de bolile monogenice convenționale, produse prin modificări ale secvenței nucleotidice a ADN; în bolile genomice este afectat genomul și nu structura unei anumite gene.

Conceptul de boli genomice a fost introdus în 1998 de către Lupski, care a demonstrat că în genomul uman există secvențe identice sau cvasiidentice[9], sub formă de duplicații segmentale (SD) sau de repetiții cu număr mic de copii – „*low copy repeats*" (LCR), situate în amplasări diferite de-a lungul cromozomilor; ele predispun la *instabilitatea genomului*, cel mai frecvent prin mecanismul de recombinare omoloagă nealelică, care generează deleții și duplicații ale segmentului (genă/segment cromozomial) delimitat de aceste „*puncte fierbinți de recombinare ectopică*" (vezi figurile 6.17 și 7.15).

La început, progresele cunoașterii în acest domeniu nou al patologiei umane au fost mici, datorită limitelor tehnologice (imposibilitatea analizei întregului genom) și conceptuale (gândirea „genocentrică" axată pe alterarea unui locus specific). Ulterior, introducerea tehnicilor de hibridiazare genomică comparativă pe microrețele (array CGH) au dus la amplificarea cunoștințelor, demonstrând că recombinarea omoloagă nealelică generează deleții, duplicații, inversii deci variații ale numărului de copii (CNV) ale segmentului genomic flancat de SD sau LCR.

> Modificările genomice se pot produce și prin alte mecanisme, diferite de recombinarea omoloagă non-alelică (NAHR)[10] inter-cromozomială, intra-cromozomială sau intra-cromatidiană, cum ar fi unirea neomoloagă a capetelor (NHEJ – *non-homologous end-joining*), retrotranspoziția, blocarea cadrului de replicare și schimbarea matrițelor (FoSTeS – *fork stalling and template switching*) sau replicarea indusă de puncte de ruptură mediate de microomologie (MMBIR – *microhomology mediated break induced replication*); ele au fost descrise în subcapitolul 7.B.1.3.

În funcție de mărimea segmentului genomic implicat și de numărul de gene localizate în segmentul remaniat, deleția și/sau duplicația rezultate prin recombinare aberantă pot produce: boli mendeliene (tabelul 9.3), sindroame cu microdeleții/microduplicații (catalogate în baza de date DECIPHER) sau aberații cromozomiale mari (inversii, izocromozomi etc.). Recent s-a demonstrat că recombinarea omoloagă nealelică este implicată și în boli complexe, multifactoriale (de exemplu, del 17q12 – DZ cu debut la maturitate, del 15q13.3 și 1q21.1 – schizofrenie, convulsii idiopatice, 16p11.2 – autism, tulburări de comportament) (tabelul 9.4), iar CNV din genomul uman au fost asociate cu susceptibilitatea la HIV, boală Crohn, glomerulonefrite, psoriazis, LES, pancreatite și multe alte boli umane. Se poate conchide că recombinarea omoloagă nealelică mediată de secvențe repetitive mici (LCR) este un fenomen frecvent (10^{-4}) și un mecanism major de producere a numeroase boli genetice.

> Deși estimarea precisă a ratei de mutație în CNV este dificilă, rata de mutație locus specifică pentru o serie de CNV *de novo* a fost estimată a varia între $2x10^{-5}$ – $1,25x10^{-4}$/locus/generație, de 100 până la 10.000 de ori mai mare decât rata de substituție nucleotidică. Diferit față de rata relativ constantă a mutațiilor punctiforme de-a lungul genomului uman, rata mutației CNV poate varia de la un locus la altul, ceea ce reflectă mecanismele diferite de formare ale CNV și arhitectura genomică locală sau regională care facilitează instabilitatea genomică.

Mecanismele moleculare prin care CNV determină un fenotip anormal sunt multiple.

- *Modificarea dozajului genic*, prin duplicația sau deleția unei gene (de exemplu, duplicația genei *PMR2* produce neuropatia periferică autozomal dominantă Charcot Marie Tooth tip IA, iar deleția ei determină neuropatia ereditară cu pareze induse de presiune, figura 6.17); multe dintre sindroamele de microdeleție sunt efecte fenotipice ale haploinsuficienței unei singure gene. Exemple reprezentative sunt: gena *RAI1* din sindromul Smith Magenis, gena *UBE3A* în sindromul Angelmann și gena *TBX1* din sindromul DiGeorge/velo-cardio-facial.
- *Întreruperea unei gene*, atunci când punctul de rupere este localizat într-o genă funcțională; el poate întrerupe gena și poate astfel cauza pierderea funcției prin inactivarea genei.
- *Fuziunea genică* poate genera un mecanism de mutație cu câștig de funcție; acest mecanism este frecvent în cazul cancerelor asociate cu translocații cromozomiale somatice specifice.

9. Acestea sunt regiuni omoloage distincte, dar nealele („*paraloage*") localizate preferențial în anumite segmente ale cromozomilor, frecvent la centromer sau telomere (estimări recente arată că ~5-10% din genomul uman este duplicat).
10. NAHR – de la *non-alelic homologous recombination.*

BCU IAȘI - CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Tabelul 9.3. Bolile genomice mendeliene

(adaptat după Vissers 2005; Gu, Beckmann şi Antonarakis 2008; Zhang şi Lupski, 2009)

Fenotip	Cod OMIM	Mod de transmitere	Locus	Genă	CNV
Sindrom Bartter tip III	# 607364	AD	1p36	*CLCNKB*	del
Boala Gaucher tip I	# 230800	AR	1q21	*GBA*	del
Sindromul Lynch tip I (cancer colorectal nonpolipozic ereditar)	# 120435	AD	2p22	*MSH2*	del
Nefronoftizia juvenilă familială	# 256100	AR	2q13	*NPHP1*	del
Blefarofimoză, ptoză şi epicantus inversus (BPES)	# 110100	AD	3q23	*FOXL2*	del
Boala Parkinson	# 168601	AD	4q22.1	*SNCA*	dup/trip
Sindromul Axenfeld-Rieger	# 180500	AD	4q25-q26	*PITX2*	del
Distrofia musculară facio-scapulo-humerală tip 1A	# 158900	AD	4q35	*FRG1?*	del
Atrofia musculară spinală tip 1	# 253300	AR	5q12.2-13.3	*SMN1, SMN2*	del/ conv. genică
Leucodistrofia cu debut la vârsta adultă	# 169500	AD	5q23.2	*LMNB1*	dup
Sindromul Sotos	# 117550	AD	5q35	*NSD1*	del/dup
Hiperplazia corticosuprarenală congenitală	+ 201910	AR	6q21.3	*CYP21A2*	del/dup
Diabetul neonatal tranzitoriu tip 1	# 601410	?	6q24	*ZFP57*	dup/UPD
Malformaţiile cerebrale cavernoase tip 2	# 603284	AD	7p13	*CCM2*	del/dup
Cefalopolisindactilia Greig	# 175700	AD	7p13	*GLI3*	del
Sindromul Saethre-Chotzen	# 101400	AD	7p21	*TWIST*	del
Sindromul Williams-Beuren	# 194050	AD	7q11.23	*ELN*	del
Microduplicaţia 7q11	# 609757	AD	7q11.23	*ELN*	dup
Pancreatita ereditară	# 167800	AD	7q35	*PRSSI*	trip
Sindromul mână/picior despicate tip 3	# 246560	AD	10q24	*FBXW4*	dup
Beta-talasemie	+ 141900	AR	11p15.5	*HBB*	del
Aniridia tip II	# 106210	AD	11p13	*PAX6*	del
Ataxiaspinocerebeloasă tip 20	% 608687	AD	11q12	*FGF3*	dup
Sindromul Prader-Willi	# 176270	AD	15q11	*SNRPN*	del/UPD
Sindromul Angelman	# 105830	AD	15q11	*UBE3A*	del/UPD
Alfa-talasemia	# 141750	AR	16p13.3	*HBA*	del
Boala polichistică renală tip 1 (ADPKD)	+ 601313	AD	16p13.3	*PKD1*	del
Sindromul Rubinstein-Taybi	# 180849	AD	16p13.3	*CREBBP*	del
Aldosteronismul cu răspuns la tratamentul cu glucocorticoizi (GRA)	# 103900	AD	8q21	*CYP11B1/2*	dup
Boala Charcot-Marie-Tooth top1A(CMTA1)	# 118220	AD	17p11.2	*PMP22*	dup
Neuropatia ereditară cu susceptibilitate la pareze presionale (HNPP)	# 162500	AD	17p11.2	*PMP22*	del
Sindromul Smith-Magenis	# 182290	AD	17p11.2	*RAI1*	del
Sindromul Potocki-Lupski	# 610883	AD	17p11.2	*RAI1*	dup
Cistinoza	* 606272	?	17p13	*CTNS*	del
Lisencefalia Miller-Dieker	# 247200	AD	17p13.3	*LIS1*	del
Neurofibromatoza tip 1 (NF1)	# 162200	AD	17q11.2	*NF1*	del/dup
Displazie renală multichistică, diabet	# 137920	AD	17q12	*HNF1B*	del/dup
Nanismul hipofizar tip 1A	# 262400	AR	17q22-q24	*GH1*	del
Boala Dyggve-Melchior-Clausen	# 223800	AR	18q12	*DYM*	dup
Sindromul Alagille tip 1	# 118450	AD	20p12	*JAG1*	del
Sindromul DiGeorge/velo-cardio-facial	# 188400	AD	22q11.2	*TBX1, s.a*	del
Microduplicatia 22q11.2	# 608363	AD	22q11.2	*TBX1, s.a*	dup
Deficit farmacogenetic al CYP2D6	+ 124030	AR	22q13.1	*CYP2D6*	del/dup
Distrofia progresivă Duchenne	# 310200	LX	Xp21.2	*DMD*	del
Retinoschizis juvenil tip 1	+ 312700	LX	Xp22.1	*RS1*	del
Ihtioză legată de X	# 308100	LX	Xp22.32	*STS*	del
Sindromul de insensibilitate la androgeni	# 300068	LX	Xq11-q12	*AR*	del

BIBLIOTECA CENTRALĂ UMF TIMIŞOARA

Fenotip	Cod OMIM	Mod de trans-mitere	Locus	Genă	CNV
Boala Menkes	# 309400	LX	Xq12-q13	*ATP7A*	del
Boala Pelizaeus-Merzbacher	# 312080	LX	Xq22.2	*PLP1*	del/dup/tri
Sindromul Alport	# 301050	LX	Xq22.3	*COL4A5*	del
Sindromul limfoproliferativ legat de X tip 1	# 308240	LX	Xq25	*SH2D1A*	del
Sindromul Lesch-Nyhan	# 300322	LX	Xq26-q27.2	*HPRT1*	del
Dicromatopsia pentru coloarea roşu/verde	# 303800	LX	Xq28	*RCP, GCP*	del
Distrofia musculară Emery Dreifuss (EMD1, EMD6)	# 310300	LX	Xq28	*EMD FHL1*	del/dup/inv
Hemofilia A	+ 306700	LX	Xq28	*F VIII*	inv/del
Incontinentia pigmenti	# 308300	LX	Xq28	*NEMO*	del
Sindromul Hunter (MPZ tip II)	# 309900	LX	Xq28	*IDS*	del/inv
Sindromul Rett-like	# 300260	LX	Xq28	*MECP2*	del/dup/trip
Azoospermia	# 415000	LY	Yq11.2	*USP9Y*	del

Tabelul 9.4. Bolile genomice cu ereditate poligenică multifactorială
(adaptat după Gu, Beckmann şi Antonarakis 2008; Zhang şi Lupski, 2009)

Fenotip	Cod OMIM	Locus	Genă	CNV
Glomerulonefrită	* 610665	1q23	*FCGR3B*	del
Autism	* 612200	3q24	*C3ORF58*	del
	# 611913	16p11.2		del/dup
Lupus eritematos sistemic	+ 120810	6p21.32	*C4A*	reducerea nr. de copii
Boală Crohn	* 602215	8p23.1	*DEFB4*	reducerea nr. de copii
	% 612278	5q33.1	*IRGM*	del
Schizofrenie	# 612474	1q21.1		del
	# 181500	15q11.2		del
	# 612001	15q13.3		del
Retard mental	# 612001	15q13.3		del
	# 610443	17q21.31		del
Susceptibilitate pentru infecţia HIV	* 601395	17q11.2	*CCL3L1*	reducerea nr. de copii
Alzheimer	+ 104760	21q21	*APP*	dup
Metabolismul medicamentelor	# 608902	22q13.1	*CYP2D6*	del/dup
Psoriazis	# 177900	1p31-3 6p21.3	*IL23R* *HLA-C*	câştig de nr. de copii
Retard mental, disartrie	# 300706	Xp11.2	*HUWEI*	dup

- *Efecte de poziţie.* Prin îndepărtarea sau alterarea secvenţelor reglatorii, CNV pot influenţa expresia genelor învecinate, ca urmare a efectului de poziţie.
- *Demascarea unei alele recesive* sau a unui polimorfism funcţional, prin deleţii care îndepărtează o alelă.
- *Efect de transvecţie potenţială.* Transvecţia (influenţa expresiei genice de către alela pereche în cromozomii omologi) este un mecanism pentru reglarea *trans.* Efectele sale sunt mediate prin deleţia elementelor reglatorii necesare pentru comunicarea dintre alele

Proiectul Genom Uman a stabilit secvenţa şi structura unui genom haploid de referinţă şi nu a putut anticipa mecanismele şi frecvenţa bolilor genomice şi nici amplitudinea CNV în genomul diploid pe care le-au evidenţiat metodele actuale de înaltă rezoluţie a analizei genomului. A apărut genomica inversă care va studia relaţiile dintre **genomotip** şi fenotip. Modificările genomice mediate de CNV definesc *genomotipul*, distinct de genotip pentru că poate include în conferirea unui anumit fenotip mai mult de o genă sau nici o genă.

3. Caracterele generale ale bolilor genetice

Bolile genetice prezintă o serie de caracteristici generale determinate de natura lor, care permit deseori medicului practician să-şi orienteze diagnosticul clinic şi etiologic.

Indiferent de tipul de boli genetice şi deci de încadrarea în una dintre cele cinci categorii precizate mai sus, în determinismul lor intervin – în proporţii variabile – factori genetici, mutaţii patogene sau neutre (generatoare de polimorfisme genetice) în celulele germinale sau somatice. Ele pot fi identificate direct prin analiza cromozomilor sau a ADN genomic şi/sau indirect prin efectele primare (la nivelul proteinelor) sau secundare (la nivel celular) (vezi „modelul”

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sicklemiei, prezentat în capitolul 4.B.3) şi, uneori, prin caracterul familial/ereditar al bolii.

Bolile genetice sunt determinate prenatal, prezente la naştere, dar manifeste clinic neonatal sau mai târziu în alte perioade de viaţă, inclusiv la adult (de exemplu, hemocromatoza, hipercolesterolemia familială sau ADPKD – ca să nu citãm decât unele boli frecvente – se manifestă fenotipic după 30-40 de ani). Acest *caracter congenital* (lat. *congenitus* = *născut cu*) este un indicator preţios pentru natura genetică a unui caracter. Dar sensul corect, subliniem încă o dată, este de *existent* la naştere, cu origine anterioară acestui moment, adică în viaţa intrauterină. De asemenea, este important să ştim şi să nu greşim punând semnul egalităţii între congenital şi genetic, deoarece există anomalii congenitale negenetice, produse de agresiuni embrio-fetale exercitate de unii agenţi externi ca, de exemplu, virusul rubeolei, alcoolismul matern sau unele medicamente (celebrul caz al talidomidei) (vezi capitolul 14). Vom mai menţiona faptul că bolile prin mutaţii somatice (de exemplu, neoplaziile) nu au, de obicei, un caracter congenital (excepţie fac, desigur, cancerele ereditare sau familiale).

Bolile genetice sunt deseori *familiale*, regăsindu-se şi la alţi membri ai familiei bolnavilor. Desigur, aceasta nu este o regulă absolută, deoarece există destule boli genetice *sporadice*, în care bolnavul (ce a suferit o *mutaţie* nouă) este singurul membru afectat al familiei, sau boli negenetice prezente la mai multe persoane din familie care au acelaşi mediu de viaţă (de exemplu, unele infecţii cronice ca tuberculoza sau hipotiroidia prin carenţă de iod în alimentaţie ori alcoolismul).

O parte dintre bolile genetice sunt *ereditare*, în sensul *transmiterii lor în succesiunea generaţiilor*, frecvent după un model mendelian. Termenul de boală genetică produsă prin mutaţii este mai general şi nu se suprapune obligatoriu cu cel de boală ereditară care presupune, evident, prezenţa afecţiunii la bolnavi din generaţii diferite. Multe boli cromozomiale şi monogenice sunt genetice, dar modificările fenotipice consecutive mutaţiilor fie sunt letale înainte de perioada de reproducere, fie determină o incapacitate de procreare (organică sau situaţională). De asemenea, circa 2/3 dintre cancere se produc prin acumularea de mutaţii succesive în unele celule somatice (ce formează o clonă anormală) care însă nu se transmit la descendenţi. De subliniat necesitatea evitării erorii de a considera ereditare unele boli exogene, pentru că sunt prezente la bolnavi din generaţii diferite; nu se poate vorbi de tuberculoză ereditară (deşi, aşa cum am menţionat, există o predipoziţie genetică) şi nici de sifilis ereditar (pentru că *Treponema pallidum* nu afectează genomul, ci doar se transmite transplacentar de la mamă la făt).

În literatura de specialitate, bolile determinate sau condiţionate genetic au mai fost caracterizate prin *concordanţa lor mult mai mare la gemenii monozigoţi*, comparativ cu gemenii dizigoţi (vezi capitolul 6.E) sau prin *distribuţia lor în anumite grupuri* etnice sau populaţionale (vezi capitolul 8.B.4). Aceste caracteristici au, firesc, mai puţină utilitate practică.

În încheierea acestei prezentări a caracterelor generale ale bolilor genetice, utile pentru a preciza natura lor, vom spune că nu este întotdeauna uşor de răspuns cu „DA" sau „NU" la întrebarea: *„boala pacientului este determinată genetic*?". Este drept că în cadrul discuţiei despre etiologia bolilor am afirmat că *orice afecţiune care nu este cert şi evident cauzată de factori externi poate fi considerată genetică*, dar aceasta este doar o generalizare care nu permite încadrarea în *boli determinate genetic* (bolile cromozomiale, bolile monogenice şi mitocondriale) sau *boli condiţionate genetic* (bolile multifactoriale). Analiza, uneori dificilă, a criteriilor menţionate mai sus va permite o clasificare adecvată, în funcţie de natura mutaţiilor. Cert este că acurateţea diagnosticului, anamneza familială, posibilităţile de explorare genetică şi, nu în ultimul rând, experienţa medicului sunt decisive. Iar acţiunea aceasta nu este numai „un joc al inteligenţei", ci un fapt necesar pentru buna îngrijire şi consiliere medicală a bolnavului şi familiei sale, o latură obligatorie a relaţiei actuale dintre medic şi pacient.

4. Impactul şi consecinţele bolilor genetice asupra stării de sănătate

Impactul şi consecinţele bolilor genetice (cromozomiale, monogenice şi multifactoriale cu predispoziţie genetică) asupra stării de sănătate este important şi deosebit de actual; el poate fi uşor demonstrat prin statisticile internaţionale şi modul în care este abordată această patologie în numeroase ţări.

Bolile genetice sunt *numeroase*. Se cunosc peste 10.000 de boli determinate sau condiţionate genetic; o parte semnificativă dintre aceste afecţiuni sunt mai frecvente (1:500 – 1:10.000 nn), altele sunt însă mult mai rare; ele au o mare diversitate şi *se regăsesc în aproape toate specialităţile medicale*. Deci, orice medic, de la medicii de familie la specialişti, vor fi confruntaţi în activitatea lor cu diferite probleme de patologie genetică.

Bolile genetice sunt, în ansamblul lor, *frecvente*; ele afectează *5-8% dintre nou-născuţi*, deci 1 din 20 de indivizi până la 25 de ani şi probabil 30-40% în tot cursul vieţii (vezi, în capitolul 1, tabelul 1.2). În fiecare an se nasc în România circa 7.500 de copii cu anomalii congenitale, boli monogenice sau cromozomiale şi alţi 10.500 vor face o afecţiune multifactorială

înainte de 25 de ani. Deci peste 18.000 de copii şi familiile lor (cu risc de recurenţă) au nevoie anual de diagnostic, explorări şi sfat genetic. La aceasta se adaugă rolul important al factorilor genetici în determinismul tulburărilor de reproducere (sterilitate şi avorturi spontane).

Bolile genetice au o *contribuţie majoră la creşterea morbidităţii şi mortalităţii*, mai ales la copii.

- Acum mai puţin de un secol, bolile produse de cauze negenetice (malnutriţie, infecţii, condiţii insalubre etc.) produceau majoritatea deceselor la copii; în secolul XX sănătatea publică s-a îmbunătăţit şi, ca rezultat, *mortalitatea infantilă* s-a redus, iar bolile genetice au devenit responsabile de cele mai multe decese la copii. De exemplu, în Marea Britanie, mortalitatea infantilă era în 1914 de 154 la 1.000 de nou-născuţi, iar bolile genetice şi malformative produceau 16,5% dintre decese; până în anul 1991, mortalitatea infantilă a scăzut spectaculos la 7,4 la 1.000 de nou-născuţi, iar „contribuţia" patologiei genetice a ajuns la aproape 50%.
- Îmbolnăvirile prin afecţiuni genetice sau anomalii congenitale determină 30-50% dintre *internările în spitalele* de copii şi circa 10% dintre internările în spitalele de adulţi. Mai mult, pacienţii cu boli genetice sunt spitalizaţi mai frecvent şi pe perioade mai lungi.
- Bolile genetice sunt *boli cronice* care realizează frecvent un handicap fizic/senzorial/motor sau mental (circa 75% dintre toate handicapurile severe ale copilăriei sunt de natură genetică). Natura cronică a multor boli genetice implică o grea *povară medicală, financiară şi emoţională* pentru pacienţii afectaţi şi familiile lor ca şi pentru societate în general.

Se poate conchide, fără rezerve, că *bolile genetice reprezintă o problemă majoră de sănătate* publică ce impune acţiuni concrete şi eficace de diagnostic şi profilaxie la nivel naţional. Genetica medicală a devenit o specialitate clinică distinctă care se ocupă de diagnosticul şi îngrijirea pacienţilor cu boli genetice, precum şi de familiile lor, prin: sfat genetic, diagnostic prenatal, *screening* neonatal sau diagnostic presimptomatic. În felul acesta, genetica este implicată în asigurarea *„sănătăţii de-a lungul generaţiilor"*. Ponderea serviciilor de genetică medicală în asistenţa medicală a populaţiei a devenit importantă şi nu mai poate fi ignorată. *„Copiii cu nevoi speciale sunt victime ale destinului şi este păcat să fie şi victime ale indiferenţei sau ignoranţei noastre."* (J.F. Kennedy).

În aceste condiţii, precum şi datorită contribuţiilor noi, majore şi eficace în prevenirea bolilor, serviciile de genetică medicală trebuie să devină o parte integrantă a strategiei sanitare a fiecărei ţări. Dacă ne referim la strategie, să nu uităm că numeroasele descoperiri din ultimele decenii au avut efecte importante asupra *teoriei şi practicii medicale.* Medicina a devenit moleculară, s-a introdus diagnosticul genotipic, au apărut farmacologia genomică şi terapia genică şi s-au pus bazele profilaxiei personalizate şi medicinii predictive. Toate acestea vor reduce semnificativ „povara genetică".

O recunoaştere recentă a impactului bolilor genetice asupra stării de sănătate este raportul (comunicarea) Comisiei Europene pentru sănătate către Parlamentul European şi Consiliul Europei intitulat *„Bolile rare – o provocare pentru Europa"* (11 noiembrie 2008). În acest raport se subliniază că bolile rare, fiecare cu o prevalenţă sub 1:2.000, sunt afecţiuni diverse (majoritatea fiind boli genetice[11]) şi complexe, care pun adesea în pericol viaţa sau provoacă o invaliditate cronică. Deoarece sunt numeroase (peste 5.000), ele afectează 6-8% din populaţie, într-un anumit moment al vieţii (circa 30 de milioane în UE şi aproape un milion în România). Cunoştinţele şi expertiza medicilor sunt limitate sau insuficiente şi de aceea bolile rare nu sunt recunoscute la timp sau sunt neglijate (diagnostic întârziat sau greşit, tratamente inadecvate), fapt ce determină reducerea calităţii vieţii şi neîncredere în sistem. Specialiştii sunt puţini, iar accesul bolnavilor la servicii de specialitate (puţine şi diferite calitativ) este deseori dificil, limitat şi inechitabil; lipsa unei identificări oficiale duce la nealocarea de fonduri şi resurse suficiente fapt ce creează un „cerc vicios".

Abordarea bolilor rare necesită o strategie generală, bazată pe eforturi combinate, pentru ameliorarea accesului şi egalităţii pacienţilor la profilaxie, diagnostic şi tratament. Numărul scăzut de pacienţi şi nevoia de resurse fac ca orice demers să nu fie eficient decât la nivel european, bazat pe valorile-cheie pe care este construită UE: cooperare şi solidaritate. Experţii care au realizat acest raport au făcut o *Propunere de recomandare* pentru Consiliul Europei intitulată *„Privind o acţiune europeană în domeniul bolilor rare"* – care prevede: (1) îmbunătăţirea recunoaşterii şi vizibilităţii bolilor rare (diseminarea cunoştinţelor, reţele de informare, ghiduri de bună practică etc.); (2) sprijinirea politicilor naţionale privind bolile rare în statele membre, care vor trebui să-şi creeze Centre naţionale de referinţă şi competenţe şi să elaboreze (până în 2013) un *Plan naţional de combatere a bolilor rare,*

12. Peste 80% din bolile rare sunt boli genetice, restul fiind cancere rare, malformaţii congenitale, boli autoimune, toxice şi infecţioase.

BCU "VICTOR BABEŞ" UNIVERSITY LIBRARY

susținut financiar în mod adecvat; (3) dezvoltarea cooperării, coordonării și reglementărilor privind bolile rare la nivel european (inclusiv integrarea Centrelor naționale într-o rețea europeană). Această *recomandare a fost adoptată de Consiliul Europei la 9 iunie 2009*, creând premizele schimbării radicale a abordării bolilor rare și deci a bolilor genetice în statele membre, inclusiv în România.

D. Medicina genomică

Finalizarea Proiectului Genom Uman (2004) a inaugurat era genomicii în medicină și sănătate publică, o etapă fundamentală în progresul medicinii. Se trece de la *genetica medicală* – care studiază mutațiile unei gene specifice și anomaliile cromozomiale precum și efectele lor fenotipice (boli genetice) la un număr mic de pacienți – la *medicina genomică*[12] – care studiază funcțiile și relațiile genelor din genom asupra fenotipului, precum și interacțiunile genomului cu mediul, la toți oamenii, sănătoși sau bolnavi.

Medicina genomică reflectă însă nu numai *o abordare cantitativă*, de la o singură genă la mai multe gene, ci și o relație calitativă, evaluând informațiile pe care le furnizează evaluarea întregului genom pentru un anumit individ, într-o situație distinctă și într-un anumit moment. Paradoxal, în această „nouă lume", genele au un rol mai mic în comparație cu interrelațiile genă-genă, genă-mediu.

Medicina genomică folosește tehnologiile genomice și bioinformatica pentru îmbunătățirea îngrijirii bolnavilor țintite pe profilul lor molecular și ajustate permanent la necesitățile lor. Medicina genomică este astfel o medicină individualizată, în esența ei personalizată și predictivă, care este preventivă, proactivă (prospectivă) și participativă („regula celor 5 P"):

- *personalizată* – deoarece adaptează și optimizează furnizarea de servicii medicale (teste și decizii) la profilul genetic al unui pacient și le ajustează la necesitățile sale;
- *predictivă* – întrucât, prin analiza genomului, stabilește corect evoluția, severitatea și prognosticul bolii unui pacient precum și predispozițiile/riscurile unei persoane la anumite afecțiuni, în special boli comune ale adultului;
- *preventivă* – deoarece, pe baza unor markeri genomici stabili și predictivi, determină măsuri personalizate de profilaxie; păstrarea sănătății va deveni mai importantă decât tratarea bolii;
- *proactivă sau prospectivă* – propunând acțiuni/măsuri adecvate unei anumite persoane înainte de manifestarea bolii, spre deosebire de medicina tradițională, reactivă, în care diagnosticul și tratamentul sunt inițiate după apariția semnelor și simptomelor de boală;
- *participativă* – întrucât implică pacientul în acțiunile de evitare a riscului, prin schimbarea stilului de viață și/sau aplicarea unor mijloace terapeutice preventive.

1. Medicina personalizată

Medicina tradițională a ultimului secol s-a bazat și se bazează în prezent pe *standarde de îngrijire medicală*, elaborate prin analiza clinică și epidemiologică a unor cohorte mari („medicina bazată pe dovezi"), valabile *în bloc* pentru toți pacienții cu o anumită boală („*blockbuster medecine*"). De exemplu, tratamentul este direcționat spre boală și nu spre pacient; un singur medicament este valabil pentru toți („*one drug fits all*"). Prescrierea și monitorizarea unui tratament se bazează deseori pe încercări care subtratează unii bolnavi și produce efecte adverse altora, iar toate la un loc costă mulți bani. Nu se ține cont, în suficientă măsură, de variabilitatea genetică a indivizilor din populație. Spuneam mai sus (subcapitolul A.2) că este o crudă ironie faptul că medicina, o profesie atât de devotată îngrijirii pacienților, le acordă din această perspectivă de abordare atât de puțină atenție.

Ideea de medicină personalizată nu este nouă și apărătorii medicinii tradiționale vor susține că au practicat-o constant deoarece au adaptat îngrijirile medicale la anumite particularități ale individului, anamnestice (istoric personal și familial, condiții socioeconomice) și biologice (de exemplu, transfuziile sangvine și transplantele, markeri biochimici etc.). Într-adevăr, medicina personalizată în sensul „tratamentul *potrivit* pentru pacientul *potrivit* la momentul *potrivit*" a fost practicată de secole, dar noțiunea de „*potrivit*" trebuie înțeleasă în contextul cunoștințelor timpului; acestea au evoluat constant, însă practica medicală bazată pe conceptul enunțat mai sus nu s-a schimbat. Atunci, ce aduce nou medicina genomică? Desigur nu conceptul de medicină personalizată *per se*, ci creșterea capacității/abilității de a defini mai precis fenotipurile moleculare ale bolilor umane și

12. Unii autori folosesc termenul echivalent de medicină moleculară care, în opinia noastră, este mai vag decât cel de medicină genomică

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

potenţialul lor de a ameliora radical îngrijirile medicale. Cu alte cuvinte, medicina tradiţională este de fapt *o medicină parţial personalizată*, realizată cu mijloace relativ rudimentare în comparaţie cu instrumentele actuale performante ale genomicii care evaluează profilele genetic, proteic, metabolic şi permite în mai mare măsură o *medicină complet personalizată.*

Medicina personalizată a secolului XXI, bazată pe analizele genomului şi proteomului (expresia genică), va adapta şi optimiza furnizarea de servicii medicale individualizate la profilul molecular al unei persoane. Acesta va permite determinarea statusului bolii la un anumit pacient, va îmbunătăţi acurateţea diagnosticului şi prognosticului, iar farmacogenomica va creşte eficacitatea tratamentului (selectarea unui anumit medicament, ajustarea dozei şi duratei de acţiune) şi siguranţa lui (prevenirea reacţiilor adverse) şi va modifica profund strategiile preventive ale bolilor cronice, iar păstrarea sănătăţii va deveni mai importantă decât tratarea bolilor. În ansamblu, se va realiza *o personalizare completă a îngrijirilor medicale.*

Evoluţia de la medicina tradiţională la medicina genomică personalizată se va face în trepte şi, evident, nu aşa de rapid. O etapă intermediară care începe să se afirme este **medicina stratificată**. Inaugurată în 2007, această abordare identifică într-un grup mare de bolnavi cu aceeaşi afecţiune un anumit subgrup, cu un anumit *profil genetic şi biologic*, pentru care este eficient un anumit tratament. Acel subgrup este definit cu ajutorul unor teste moleculare (de obicei de expresie genică) care analizează unul sau câţiva markeri. Exemplul cel mai elocvent este cancerul de sân. În 1970 s-a introdus terapia antiestrogenică (tamoxifen) care acţionează eficace la un subgrup de bolnave, identificat prin teste ce determină statusul receptorului hormonal. În 1990 s-a introdus tratamentul cu un anticorp monoclonal (*trastuzumab* sau *Herceptin*) foarte eficient la un subgrup de bolnave cu cancer de sân ce prezintă hiperexpresia proteinei HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*), determinată printr-un test imunohistochimic (hercep test).

Implementarea medicinii personalizate, cu scop diagnostic şi terapeutic, este cert o acţiune de durată care implică numeroşi factori: industria diagnostică şi farmaceutică, medicii, asiguratorii de servicii medicale, pacienţii ş.a. Probabil că handicapul major va fi unul conceptual care să permită o educaţie adecvată şi cunoştinţe actualizate despre medicina genomică (vezi şi 1.3).

Ilustrativ este exemplul farmacogeneticii; deşi variaţiile individuale, determinate genetic, ale farmacocineticii şi farmacodinamiei unui medicament sunt cunoscute de mult timp şi există unele teste pentru identificarea lor, clinicienii preferă să acţioneze *reactiv* şi nu *proactiv*. Bolnavului i se dă o doză standard de medicament şi este monitorizat; dacă medicamentul nu are efect sau apar efecte adverse se schimbă doza sau medicamentul. Explicaţiile sunt multiple: rezistenţa medicilor şi deficitul de cunoaştere; infrastructura şi logistica necesară; dificultăţile de integrare în practică a genotipării, care necesită timp, iar medicaţia trebuie prescrisă. Probabil că soluţia optimizării tratamentului va fi elaborarea unor teste moleculare rapide, efectuabile în timp real, la patul bolnavului precum şi genotiparea de rutină a fiecărei persoane, care va fi dotată cu o înregistrare electronică utilizabilă la momentul oportun.

2. Medicina predictivă

Medicina predictivă realizează predicţia unor efecte adverse la medicamente sau predicţia personalizată a riscului unei viitoare boli la o persoană sănătoasă şi instituirea măsurilor profilactice adecvate pentru a preveni boala sau a reduce impactul ei asupra pacientului. Există deja o serie de teste moleculare care pot identifica mutaţii în anumite gene ce determină un risc crescut de boală. Două exemple sunt edificatoare: factorul V Leiden şi riscul crescut de tromboze venoase profunde sau mutaţia genei *BRCA1* şi riscul crescut (65%) de cancer de sân. De asemenea, *screening*-ul genetic populaţional sau testarea genetică presimptomatică, componente preţioase ale geneticii medicale (vezi capitolul 19), pot fi incluse în acest tip de medicină predictivă.

Progresele rapide ale tehnologiilor de evaluare a profilului întregului genom uman deschid noi perspective pentru *screening*-ul populaţional la scară mare şi creează premizele cele mai serioase pentru dezvoltarea medicinii predictive prin identificarea persoanelor sănătoase cu risc genetic crescut atât pentru boli monogenice, dar mai ales pentru boli multifactoriale complexe comune. Persoanelor cu risc crescut li se vor oferi sfaturi de schimbare a stilului de viaţă, creşterea supravegherii medicale, medicaţie etc.

Trebuie să subliniem două elemente: (1) predicţia se bazează pe probabilităţi (nu este obligatoriu ca boala să apară) şi se adresează individului (şi nu unui grup); (2) medicina predictivă schimbă paradigma fundamentală a medicinii din *reactivă* (tratarea bolii) în *proactivă* (prevenirea bolii) şi include obligatoriu o componentă *participativă* ce implică direct pacientul. Succesul medicinii predictive va depinde de asigurarea unor intervenţii eficiente (bazate pe probe) pentru prevenirea bolii şi disponibilitatea persoanei cu risc de a-şi schimba comportamentul faţă de sănătatea sa.

Rezultatele obţinute prin studiile asociere a întregului genom (GWAS; vezi capitolele 5 şi 14) sunt încă modeste; alele de susceptibilitate cert identificate şi

confirmate prin studii replicative sunt puține, iar riscul lor de boală era mic. A devenit clar că alelele ce conferă susceptibilitatea acționează combinat cu multe alte alele și predicția riscului de boală este dificilă.

Pesimiștii consideră că medicina genomică predictivă nu are viitor deoarece prezicerea riscului pentru cele mai multe boli multifactoriale nu este fezabilă (cel puțin din punct de vedere economic) și este puțin utilă în absența unor posibilități preventive sau terapeutice eficace. Optimiștii se bazează pe ipoteza „*boli comune – variante comune*", care statuează că alelele de susceptibilitate au apărut prin mutații la populațiile umane acum circa 100.000 de ani și deci există și pot fi identificate prin studii de asociație caz-control ample (la câteva mii de persoane); această ipoteză posibilă va trebui totuși validată. În aceste condiții succesul predicției va depinde de *screening*-ul populațional a mai multor variante genetice care prin combinare să determine „un scor de risc". Eficiența *screening*-ului genomic va crește dacă testarea pentru alele multiple de susceptibilitate va fi corelată cu istoricul familial de boală.

3. Domenii de aplicație a medicinei genomice

- **Farmacogenomica** studiază relația dintre un medicament specific, variațiile în secvența ADN și răspunsul la medicament (vezi secțiunea B.2.3). Așa cum am arătat în subcapitolele precedente, farmacogenomica stă la baza medicinii personalizate.
- **Toxigenomica** – domeniu care studiază interacțiunile complexe dintre întregul genom, substanțe chimice din mediu și boală. Când celulele sunt expuse la stres, medicamente sau toxice ele răspund prin modificarea modelului de expresie genică. Folosind tehnologiile bazate pe microrețele ADN specialiștii în medicina mediului sau toxicologie vor putea monitoriza interacțiunile dintre mii de gene obținând o perspectivă globală asupra modului în care organismul răspunde la medicamente sau toxice și identificând căile de a reduce sau preveni alterările moleculare sau biochimice produse de substanțele chimice. Practic, toxigenomica combină instrumentele convenționale ale toxicologiei (determinări enzimatice, biochimie clinică, patologie, histopatologie) cu noile abordări ale transcriptomicii, proteomicii, metabolomicii și bioinformaticii – producând noi informații și oportunități.
- **Nutrigenomica** sau **genomica nutrițională** este aplicarea genomicii, transcriptomicii, proteomicii, metabolomicii și bioinformaticii în cercetările nutriționale, pentru a stabili efectele alimentației asupra funcției genomului precum și acțiunile benefice sau nocive/adverse ale componentelor dietei, la nivel individual sau populațional. Substanțele nutritive influențează multiple răspunsuri fiziologice ce afectează stabilitatea și expresia genomului sau amprentarea (*imprinting*) lui. Înțelegerea acestor interacțiuni va permite evaluarea beneficiilor și riscurilor diferitelor recomandări dietetice precum, reducerea riscului unor consecințe neașteptate și prevenirea sau managementul bolilor cronice comune.
- **Metabonomică și metabolomică.** Metabolismul reprezintă suma proceselor prin care se produce și se folosește energia în organism, se sintetizează componentele celulare și se catabolizează deșeurile. *Metabonomica* se ocupă cu evaluarea răspunsului metabolic complet al unui organism la modificările genetice și stimulii mediului. Termenul de *metabolomica* se referă la metabonomica la nivelul unui singur tip celular.

Integrarea informațiilor furnizate de genomică, proteomică și metabonomică se numește **sisteomică** sau medicina sistemelor care își propune ca prin descifrarea *rețelelor funcționale și reglatorii*, să permită înțelegerea profundă a mecanismelor bolilor umane, dezvoltarea unor markeri performanți pentru diagnosticul și prognosticul bolilor umane și noi tipuri de medicamente. Probabil că „ *...medicina sistemelor va fi viitorul medicinii genomice și îngrijirilor medicale*" (Auffray, 2009).

4. Integrarea medicinei genomice în practica medicală

Descifrarea structurii și funcției genomului uman nu va schimba imediat și radical practica medicală, dar cu siguranță medicina genomică va transforma profund medicina clinică. Transformările potențiale ale practicii medicale se vor face treptat, vor fi lente, dar profunde. Vom traversa o etapă de tranziție ce implică mai multe acțiuni.

- Îmbunătățirea educației medicale pentru ca să fim pregătiți să înțelegem și să aplicăm medicina genomică[13]. *Educația genomică* a studenților, rezidenților și medicilor devine o prioritate pentru a deprinde cunoștințe, aptitudini și atitudini necesare folosirii cu succes a medicinii genomice. „*În stadiul*

13. Unii practicieni mai cred și astăzi că rolul geneticii medicale și, cu atât mai mult, al medicinii genomice este restrâns la cercetare, având aplicații clinice limitate.

BCU "VICTOR BABEȘ" UNIVERSITY LIBRARY

actual avem nevoie de cunoştinţe, vocabular şi mai ales de un concept larg despre rolul genomicii pentru a evita riscul de a nu înţelege medicina viitorului" (Dumont-Driscoll, 2002).

- Schimbarea treptată a gândirii clinice şi managementului medical de la diagnostic şi tratament la predicţie şi profilaxie individuală; în medicina tradiţională pe primul plan este boala, în medicina genomică important este bolnavul şi deci personalizarea completă a îngrijirilor medicale.
- Transferul cunoştinţelor rezultate din cercetarea genomică în clinică şi, mai ales, furnizarea unor date relevante, dovezi solide, soluţii clare şi convingătoare pentru medici, cu opţiuni concrete la patul bolnavului; încorporarea noilor abilităţi de diagnostic, tratament şi profilaxie într-un sistem nou, coerent, construit însă pe vechile paradigme medicale.
- Acţiuni concrete în industria mijloacelor de diagnostic şi industria de medicamente pentru încorporarea progreselor genomicii în produse fiabile, uşor de folosit în practică.
- Schimbarea infrastructurii şi logisticii laboratoarelor din spitale pentru a utiliza în timp real metodele de diagnostic şi profil molecular.
- Asiguratorii serviciilor medicale trebuie să ramburseze costurile testelor de diagnostic şi medicaţia individualizată, mai scumpe pe termen scurt, dar profitabile pe termen lung, prin reducerea morbidităţii.
- Rezolvarea unor aspecte etice, legale şi sociale pentru a preveni folosirea discriminatorie a informaţiilor genetice predictive în asigurările medicale şi angajări şi pentru a permite accesul echitabil la tehnologiile genomice.

În contextul acţiunilor enunţate mai sus apare o întrebare principială: *ce se va întâmpla cu genetica medicală sau ce rol vor avea genetica medicală şi specialiştii din acest domeniu în implementarea medicinii genomice?* Răspunsul necesită probabil o scurtă rememorare a datelor esenţiale pentru definirea şi acţiunile geneticii medicale şi medicinii genomice.

Genetica medicală a evoluat în ultimele decenii de la o ştiinţă orientată spre cercetare (aplicaţiile geneticii umane în medicină) la o specialitate clinică distinctă, orientată spre servicii (devenind în SUA, în 1991, a 24-a *specialitate primară* în medicină). Serviciile de genetică medicală sunt servicii integrate de clinică şi laborator oferite celor afectaţi de o boală ce are o componentă genetică semnificativă, precum şi familiilor lor.

Medicina genomică reprezintă aplicaţiile genomicii la practica medicală. Prin folosirea unor tehnologii performante de evaluare a întregului genom (sau cel puţin a unei bune părţi din el) şi a derivaţilor săi (transcriptom, proteom, metabolom), pe scară largă, la aproape fiecare problemă medicală, şi în combinaţie cu datele clinice, medicina genomică va determina riscurile individuale la anumite boli şi stabili managementul individualizat al pacienţilor; aşa cum am mai spus ea va fi o medicină predictivă, preventivă şi personalizată. Dar spre deosebire de genetica medicală care se preocupă de îngrijirea unui număr mic de pacienţi, medicina genomică se va aplica la îngrijirea multor/tuturor oamenilor.

Ce rol vor avea medicii geneticieni în implementarea medicinii genomice?

- Medicii geneticieni vor continua să facă ceea ce au făcut în ultimele decenii, dar vor trebui să-şi lărgească preocupările la bolile comune multifactoriale, ţinta principală a medicinii genomice. Aceasta presupune însă dobândirea de noi cunoştinţe şi competenţe prin instrucţie suplimentară, intensă şi permanent actualizată.
- Specialiştii non-geneticieni şi/sau laboratoarele genomice nu vor fi foarte probabil capabili să rezolve singuri complexitatea interpretării testelor genetice şi stabilirea riscurilor, aplicate la scară mare; ei nu vor avea nici timpul şi nici expertiza necesară. Ei vor trebui să facă echipă cu medicii geneticieni care trebuie să fie mai puţin pasivi, mai instruiţi, mai colaborativi.
- Principalele probleme pentru geneticieni şi non-geneticieni vor fi timpul, cunoştinţele şi banii. *Timp* pentru evaluarea specială, complexă, a riscului şi mangementrului individualizat. *Cunoştinţe* pentru efectuarea acestor evaluări (aceasta va presupune regândirea pregătirii universitare şi post-universitare (rezidenţiat, educaţie medicală continuă). *Bani* pentru a plăti corespunzător serviciile medicale şi timpul pe care îl necesită evaluările riscului şi intervenţiile preventive.

În final, putem concluziona că problema esenţială pentru implementarea medicinii genomice în practica medicală este probabil reorganizarea învăţământului medical şi a sistemului de sănătate pentru a facilita şi nu împiedica integrarea genomicii în medicină. Dificultăţile sunt enorme, dar cert este că medicina genomică sau moleculară va fi viitorul medicinii.

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bibliografie specifică selectivă

1. Abel L, Casanova JL. *Genetic predisposition to clinical tuberculosis: bridging the gap between simple and complex inheritance.* Am J Hum Genet 2000; 67:274-277.
2. Alcais A, Abel L, Casanova JL. *Human genetics of infectious diseases.* În Speicher MR *et al. Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010, 403-416.
3. Auffray C, Chen Z, Hood L. *Systems medicine: the future of medical genomics and healthcare.* Genome medecine 2009; 1:2, doi:10.1186/gm2.
4. Avard D, Knoppers BM. *Genomic medecine: considerations for health professionals and the public.* Genome medecine 2009, I:25.
5. Carvalho CMB, Zhang F, Lupski JR. *Genomic disorders: a window into human gene and genome evolution.* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0906222107.
6. Cooke GS, Hill AVS. *Genetics of susceptibility to human infectious disease.* Nat Rev Genetics 2001; 2:967-977.
7. Costa LG. *The emerging field of ecogenetics.* Neurotoxicology 2000; 21:85-89.
8. Evans WE, McLeod HL. *Drug therapy: pharmacogenomics-drug disposition, drug targets and side effects.* N Engl J Med 2003; 348:538-549.
9. Feero WG, Guttmacher AE, Collins FS. *Genomic medecine – an updated primer.* N Engl J Med 2010; 362:2001-2011.
10. Grossman I, Goldstein DB. *Pharmacogenetics and Pharmacogenomics.* În HF Willard, GS Ginsburg (ed.). *Genomic and Personalized Medicine.* Elsevier Inc, 2009, 321-334.
11. Hamburg MA, Collins FS. *The path to personalized medicine.* N Engl J Med 2010; 363:301-304.
12. Heard E, Tishkoff S, Todd Ja *et al. Ten years of genetics and genomics: what have we achieved and where are we heading.* Nature Rev Genet 2010; 11:723-733.
13. Ingelman-Sundberg M. *Pharmacogenomic Biomarkers for Prediction of Severe Adverse Drug Reactions.* N Engl J Med 2008; 358:637-639.
14. Kalow W, Grant DM. *Pharmacogenetics.* În Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases.* ed. a VII-a. McGraw-Hill, New York 1995, 1981-2030.
15. Kalow W. *Pharmacogenetics in biological perspective.* Pharmacol Reviews 1997; 49:369-380.
16. Lupski JR. *Genomic disorders ten years on.* Genome Med 2009; I:42.
17. Manolio TA. *Genome wide association studies and assessment of the risk of disease.* N Engl J Med 2010; 363:166-176.
18. McDermont U, Downing JR, Stratton MR. *Genomics and the continuum of cancer care.* N Engl J Med 2011; 364:340-350.
19. Motulsky AG. *Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects and folic acid.* Am J Hum Genet 1996; 58:17-20.
20. Norton ML. *Genome medicine: the future of medicine.* Genome med 2009; 1:1.
21. Reich T, Hinrichs A, Beirut L. *Genetic studies of alcoholism and substance dependence.* Am J Hum Genet 1999; 65:599-605.
22. Roses AD. *Pharmacogenetics.* Human Molec Genetics 2001; 10:2261-2267.
23. Sheffield LJ, Phillimore HE. *Clinical Use of Pharmacogenomic Tests in 2009.* Clin Biochem Rev 2009; 30:55-65.
24. Spraggs FC, Beena KT, Edbrooke R.M, Allen RD. *Role of Pharmacogenomics in Drug Development.* În Willard HF, Ginsburg GS (ed.). *Genomic and Personalized Medicine.* Elsevier Inc, 2009, 343-356.
25. Steels FR. *Personalized medicine: something old, something new.* www.medscape.com/ viewarticle/586267.
26. Tepper RI, Roubenoff R. *The Role of Genomics and Genetics in Drug Discovery and Development.* În Willard HF, Ginsburg GS (ed.). *Genomic and Personalized Medicine.* Academic Press, 2009, 335-342.
27. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. *Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation.* Anal Bioanal Chem 2008; 392:1093-1108.
28. Walley NM, Nicoletti P, Goldstein BD. *Pharmacogenetics.* În Speicher MR *et al. Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010, 635-647.
29. Weinsihilboum R. *Genomic medicine: Inheritance and drug Response.* N Engl J Med 2003; 348:529-537.
30. Weinshilboum RM, Wang L. *Pharmacogenetics and Pharmacogenomics: Development, Science, and Translation.* Annual Rev Genomics Hum Genet 2006; 7:223-245.
31. Willard HF. *Organisation, variation and expression of the human genome as a foundation of Genomic and personalized medicine.* În Willard HF, Ginsburg GS (ed.). *Genomic and Personalized Medicine,* Elsevier Inc, 2009, 4-21.
32. Wolf CR, Smith G, Smith RL. *Pharmacogenetics.* BMJ 2000; 320:987-990.
33. Woodcock J, Lesko LJ. *Tailoring Treatment for the Outliers.* N Engl J Med 2009; 360:811-813.

BCU CLUJ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 10

CONSULTUL ŞI SFATUL GENETIC

Bolile genetice şi malformative sunt foarte *diverse*, se manifestă la vârste diferite şi afectează orice sistem sau organ; de aceea, bolnavii cu aceste afecţiuni se pot adresa diferitelor categorii de medici specialişti. În consecinţă, cunoaşterea unor principii de genetică medicală este *necesară şi utilă oricărui practician* confruntat cu patologia genetică, acesta trebuind să cunoască şi să aplice metodologia generală a *consultului genetic*, să indice adecvat efectuarea unor *explorări genetice*, să înţeleagă şi să interpreteze corect rezultatele lor şi, nu în ultimul rând, să poată oferi – în limitele sale de competenţă – un *sfat genetic* corect pentru pacient şi/sau familia sa, confruntată cu un risc genetic. Consultul şi sfatul genetic sunt însă activităţi specifice medicilor specializaţi în genetică medicală

A. Consultul genetic

1. Definiţie. Obiective

***Consultul genetic** este un act medical specializat şi complex prin care se stabileşte sau se evaluează diagnosticul unei boli, se precizează natura sau componenta sa genetică şi se acordă un sfat genetic bolnavului sau familiei sale.*

- Primul obiectiv al consultului genetic este *realizarea unui diagnostic clinic cât mai precis*; acest lucru este deseori dificil, dar imperios necesar deoarece, mai mult decât în alte specialităţi, el condiţionează direct prognosticul, calitatea îngrijirilor medicale, prevenirea complicaţiilor şi corectitudinea sfatului genetic, de care depind opţiunile reproductive ale pacientului sau cuplului.
- Al doilea obiectiv este *stabilirea naturii sau a componentei genetice a bolii*; aceasta este o activitate specifică medicului genetician care, pe baza istoricului familial şi a explorărilor genetice, trebuie să diferenţieze bolile genetice de cele condiţionate genetic sau negenetice.
- Al treilea obiectiv al consultului genetic este acordarea *sfatului genetic*, o acţiune caracteristică consultului genetic, prin care bolnavul sau rudele sale cu risc sunt sfătuiţi în ceea ce priveşte: *natura* şi *consecinţele bolii* (istoria naturală, prognosticul), *riscul de recurenţă* şi *căile prin care riscul poate fi redus sau prevenit* (opţiunile reproductive, posibilităţile de diagnostic prenatal).

Deci consultul genetic este un act medical complex care presupune o temeinică pregătire de specialitate, o mare disponibilitate de colaborare cu alţi specialişti, într-o echipă în care *geneticianul reprezintă punctul de convergenţă* (decizie), el fiind cel ce stabileşte concluziile finale. Nu în ultimul rând, este nevoie de *o infinită dorinţă de a ajuta şi alina* bolnavii confruntaţi cu un handicap pe viaţă, precum şi pe părinţii lor ce trăiesc drama unei neîmpliniri şi tragedia unui destin genetic potrivnic.

2. Cadrul organizatoric

Consultul genetic este realizat de către un **medic genetician** care trebuie să aibă o pregătire medicală de *bază* – pentru a înţelege boli ce afectează orice organ, la orice vârstă[1] – precum şi o pregătire *specifică* în domeniul geneticii medicale, *solidă şi mereu actualizată*. În plus, medicul genetician trebuie să posede anumite trăsături de personalitate şi *calităţi psihologice* pentru a putea face faţă dificultăţilor inerente pe care le ridică diagnosticul şi îngrijirea bolnavilor cronici, deseori cu un handicap important.

1. *„...Geneticienii clinicieni sunt probabil ultimii generalişti adevăraţi în medicina actuală"* (Hall, 1999).

BCU "VICTOR BABEŞ" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Abordarea corectă şi completă a patologiei genetice şi malformative nu se poate realiza decât în **servicii (centre) de genetică medicală** specializate (vezi subcapitolul D). Obiectivul principal al acestor servicii este de a răspunde necesităţilor individului şi familiei care sunt confruntaţi cu o boală genetică, în special a dorinţei lor de a şti dacă au sau nu un *risc de a dezvolta sau transmite* o boală cu o componentă genetică.

Serviciile de genetică *se deosebesc de alte servicii medicale* pentru că:

- realizează diagnostice, investigaţii şi îngrijiri medicale pentru boli care afectează *orice sistem de organe şi la orice vârstă*; acest lucru implică multiple investigaţii, în diferite specialităţi; planificarea, coordonarea şi centralizarea rezultatelor revine medicului genetician;
- *unitatea de studiu este familia*, şi nu individul;
- *acordă sfat genetic*, caracteristică definitorie a serviciilor de genetică;
- cuprind într-o structură integrată – clinică şi de laborator – o *echipă multidisciplinară* de personal medical (geneticieni) şi non-medical (psihologi, biologi, asistenţi sociali etc.).

3. Indicaţiile consultului genetic

În mod obişnuit, consultul genetic este solicitat de un pacient sau un cuplu, confruntat cu o problemă de genetică.

- *Persoană bolnavă* – cu o afecţiune posibil genetică sau cu o anomalie congenitală – solicită diagnostic, îngrijire şi/sau evaluarea riscului de recurenţă la descendenţi.
- *Persoană sănătoasă*, dar cu risc genetic crescut (are o rudă apropiată afectată), doreşte să ştie dacă „va face" boala (diagnostic presimptomatic) sau dacă va transmite o genă mutantă la urmaşi; mult mai rar el solicită un sfat premarital, determinat de o viitoare uniune consangvină (de regulă veri).
- *Cuplul sănătos* – poate solicita diagnostic şi sfat genetic:
  - *preconcepţional* – în situaţia unor rude afectate, când vârsta maternă depăşeşte 35 de ani, există tulburări de reproducere (infertilitate) sau consangvinitate;
  - *prenatal* – în cazul unor antecedente familiale pozitive, după expunerea la teratogeni sau după identificarea unor semne ecografice de alarmă;
  - *postnatal* – după naşterea unui copil afectat (anomalii congenitale) sau atunci când la un copil apar tulburări de creştere sau dezvoltare psihomotorie, boli metabolice, tulburări pubertare.

Deseori consultul genetic este *indicat de alţi specialişti* care solicită medicului genetician o opinie de diagnostic, evaluarea etiologiei genetice, stabilirea unui prognostic şi posibilităţilor de tratament, dar mai ales pentru a discuta cu consultanţii aspectele genetice ale bolii, riscul de recurenţă la o altă sarcină şi, eventual, posibilităţile unui diagnostic prenatal la o sarcină viitoare.

4. Principiile de bază ale consultului genetic

Complexitatea consultului genetic impune aplicarea unor principii de acţiune. Pe baza experienţei dobândite în acest domeniu, propunem următorul decalog:

(1) *Evaluarea pacientului şi familiei* sale se va face metodic, în etape sau trepte succesive de acţiune, fiecare cu obiective şi activităţi distincte.

(2) *Examenul clinic* este decisiv, chiar în condiţiile medicinii moderne dominată de tehnologii sofisticate şi performante; întoarcerea la genetica clinică este absolut necesară, deoarece *„...fără fenotip nu poate exista un genotip, iar fără clinică nu există fenotip"*.

(3) Aceeaşi atenţie se va acorda şi *anamnezei personale* şi mai ales *anamnezei familiale*, care furnizează informaţii preţioase pentru diagnosticul şi managementul pacientului şi familiei sale. Succesul acestei acţiuni va depinde de tehnica şi perseverenţa medicului (care trebuie să se convingă de veridicitatea faptelor), precum şi de timpul alocat (*carenţa factorului T – timp* – este una dintre „bolile profesionale" ale medicului actual).

(4) Începând de la primul contact cu pacientul şi familia sa şi apoi în toate etapele diagnosticului, procesul de evaluare va fi dublat şi de un *sprijin psihologic*, atent şi constant. Medicul va trebui să susţină şi să încurajeze permanent familia pacientului, confruntată acut cu o situaţie dramatică.

(5) În aceste condiţii, se va acorda o atenţie specială şi un *timp adecvat procesului de comunicare* care va fi simplă şi clară, adaptată fiecărei etape de acţiune (explicând ce se face şi de ce) şi nivelului de percepţie al pacientului/părinţilor, plină de înţelegere şi simpatie. Chiar dacă uneori nu putem face multe pentru consultanţi, în mod sigur putem să le alinăm suferinţa.

(6) Problemele geneticii clinice *se abordează şi se rezolvă în echipă*, în sensul larg al cuvântului, fapt ce presupune colaborări eficiente cu alţi colegi de diferite specialităţi clinice şi paraclinice, consultarea

BCU "SUCEAVA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

altor specialişti în genetică medicală pentru verificarea şi validarea concluziilor. Să nu uităm că diagnosticul genetic este „pus pe viaţă" şi consecinţele sale sunt imense.

(7) *Medicul genetician reprezintă punctul de convergenţă* al tuturor datelor despre consultanţi, obţinute în etape succesive, din surse variate. Acest lucru impune colectarea, ordonarea şi interpretarea datelor sau, cu alte cuvinte, un stil special de lucru, ce trebuie dublat de răbdare şi prudenţă, pentru a evita concluzii şi diagnostice pripite, până ce faptele nu vor fi bine stabilite şi documentate. Este mai bine să nu greşim decât să punem un diagnostic cu orice preţ.

(8) *Arta diagnosticului genetic* (caseta 10.1) se bazează pe un fond solid şi complet de cunoştinţe bazale, reprezentat de cunoaşterea morfologiei şi înţelegerii morfogenezei normale şi anormale, precum şi a principiilor de genetică umană şi medicală; acest fond de cunoştinţe catalizează un diagnostic, deoarece permite „ochilor minţii" să se îndrepte spre elemente ce altfel ar putea fi omise. Cu timpul se va adăuga o experienţă necesară, dar actualizarea permanentă a cunoştinţelor rămâne obligatorie.

CASETA 10.1

Arta pierdută a dismorfologiei

Dismorfologia („studiul morfologiei umane anormale") este un domeniu al geneticii clinice care se ocupă cu recunoaşterea şi diagnosticul unor sindroame specifice la pacienţi cu anomalii congenitale multiple, majore şi/sau minore. Dismorfiile sunt „forme anormale", deci caractere (defecte) structurale (de obicei vizibile) care nu se regăsesc la persoane de aceeaşi vârstă, etnie sau familie. Sindroamele dismorfice sunt entităţi clinice distincte caracterizate printr-o combinaţie specifică de caractere structurale (dismorfii) care au o cauză sau un mecanism comun.

Dismorfologia este o artă şi o ştiinţă deoarece dismorfologii şi-au dezvoltat abilităţi care „le permit un succes constant acolo unde alţii au eşecuri repetate". Dismorfologia este o artă întrucât diagnosticul dismorfologic este un diagnostic vizual şi mental care presupune o serie de aptitudini (spirit de observaţie, perseverenţă, prudenţă) şi trăsături de personalitate. Dismorfologia este şi o ştiinţă deoarece necesită nu numai abilităţi, ci şi cunoştinţe (de exemplu, despre morfologia şi morfogeneza normală şi anormală), dublate de o metodologie riguroasă de obţinere şi , interpretare a datelor, care catalizează un diagnostic, deoarece permite „ochilor minţii" să se îndrepte spre semne/sindroame ce ar putea fi omise.

Esenţa dismorfologiei este diagnosticarea unui sindrom specific. Dar diagnosticul clinic este subiectiv şi prezumtiv; el trebuie validat prin teste genetice, atunci când este posibil, sau – în absenţa lor – pe baza unor criterii clinice. Deseori nu se poate pune însă un diagnostic specific; în acest caz se recomandă observarea repetată, în timp, a pacientului, consultarea unor baze de date (POSSUM, OMD, Orphanet, GeneClinic), consultarea literaturii de specialitate şi a altor colegi (cu intuiţie şi/sau experienţă mai mare).

Dismorfologia este considerată greşit ca „un domeniu limitat / îngust ce se aplică unui număr mic de pacienţi" şi fără „prea mare importanţă clinică", mai ales în stadiul actual al geneticii moleculare. Se uită/ignoră că dismorfologia se ocupă de boli ce afectează orice organ, iar anomaliile congenitale majore se găsesc la peste 3% din nou-născuţii vii, din care circa 1/3 au dismorfii multiple (50% fiind sindroame specifice). Se uită de asemenea că „fără fenotip nu poate exista (înţelege) genotipul, iar fără clinică nu există fenotip".

Din păcate dismorfologia devine, treptat, în România, „o artă... pierdută" deoarece:

- *neonatologii şi pediatrii, primii care se confruntă cu copii dismorfici, sunt acum mai puţin interesaţi de acest domeniu, lăsând „greul" pe seama geneticienilor;*
- *pregătirea rezidenţilor de genetică medicală este deseori lacunară în dismorfologie/sindromologie;*
- *cadrul oficial al exercitării/practicii geneticii medicale în servicii clinice speciale lipseşte;*
- *stabilirea unui diagnostic specific la copii dismorfici este pentru mulţi pediatri sau geneticieni „o barieră formidabilă", descurajantă, în special datorită unei pregătiri şi experienţe reduse.*

Numărul mic de unităţi clinice şi de geneticieni care lucrează efectiv în clinică precum şi „arta... pierdută a dismorfologiei" sunt însă o problemă importantă, deoarece realitatea asistenţei medicale a bolilor rare în general este dureroasă: „bolile sunt rare, dar, fiind numeroase, bolnavii sunt mulţi, iar medicii care ar trebui să se ocupe de ei sunt prea puţini".

„Arta diagnosticului" clinic în dismorfologie/genetică clinică este însă o îndemânare accesibilă, ce poate fi obţinută de toţi cei care doresc acest lucru şi care poate fi perfecţionată prin exerciţiu. Problema esenţială este să găsim „doritori şi formatori" pentru ca fiecare centru universitar să aibă un Centru puternic de genetică medicală, care să rezolve competent solicitările multiple din regiune.

BCU "IULIU HAŢIEGANU" LIBRARY

(9) Este cert că nimeni nu poate şti totul în genetica clinică, iar pentru *începători* numărul mare de entităţi genetice este foarte descurajant; în aceste condiţii, *biblioteca, computerul şi internetul* sunt soluţiile salvatoare. Este obligatoriu ca geneticianul să stăpânească accesul *on line* la informaţii şi baze de date.

(10) Nu este posibil întotdeauna un diagnostic clinic şi genetic, dar – după principiul *„nu ai reuşit, continuă"* – medicul genetician trebuie să aibă abilitatea de a fi răbdător şi tenace atunci când nu a reuşit un diagnostic specific şi precis. De aceea, *urmărirea în timp* a bolnavului şi familiei sale va aduce cu siguranţă beneficii diagnostice şi de îngrijire.

5. Etapele consultului genetic

Aşa cum am precizat, evaluarea pacientului şi familiei sale se va face metodic, în etape sau trepte succesive de acţiune, fiecare având obiective şi activităţi distincte:

- evaluarea iniţială a bolnavului (anamneză, examen fizic) → opţiuni de diagnostic;
- alte examene clinice şi explorări paraclinice;
- analiza şi interpretarea datelor → diagnostic prezumtiv;
- explorări genetice;
- finalizarea consultului genetic → diagnostic specific; prognostic; plan de îngrijire; risc genetic de recurenţă;
- comunicarea concluziilor → sfat genetic;
- urmărirea evoluţiei bolnavului;
- contactarea rudelor cu risc genetic crescut.

În toate etapele, procesul de evaluare va fi dublat şi de un *sprijin psihologic* corespunzător.

5.1. Contactul iniţial cu bolnavul

Primul contact cu bolnavul, deseori copil însoţit de cineva din familie, este important pentru a stabili o atmosferă de încredere şi cooperare. De obicei se începe cu întrebările clasice prin care se identifică *motivul consultaţiei* şi problemele majore care frământă pacientul sau familia sa. Stabilirea obiectivului consultaţiei va concentra atenţia medicului asupra anumitor probleme şi va permite şi stabilirea *nivelului de anxietate* al consultanţilor.

Perioada iniţială de acomodare reciprocă (uneori foarte necesară) şi de observare a comportamentului copilului poate fi prelungită prin *analiza documentelor medicale* existente din care important este *să se identifice elementele obiective*. Urmează apoi anamneza detaliată şi examenul fizic minuţios şi complet.

5.2. Anamneza personală şi familială

Anamneza se desfăşoară pe două direcţii majore: anamneza personală şi familială.

a) Anamneza medicală personală vizează *toate etapele vieţii individului* şi, evident, *istoricul bolii*. Desigur, vârsta pacientului şi tipul de patologie vor influenţa *secvenţa şi ponderea informaţiilor*. Schematic, putem deosebi:

(1) Anamneza gestaţională – care se va referi la concepţie, evoluţia sarcinii şi naştere.

- *Concepţia*: antecedentele reproductive şi vârsta părinţilor, eventualele lor boli cronice (diabet zaharat, epilepsie ş.a.), grupele sangvine, data debutului sarcinii.
- *Evoluţia sarcinii*: boli şi expuneri la factori teratogeni în trimestrul I, apariţia şi evoluţia mişcărilor fetale, cantitatea de lichid amniotic şi datele ecografice.
- *Naşterea*: vârsta gestaţională, durata travaliului, prezentaţia, anomalii ale lichidului amniotic, ale cordonului ombilical şi placentei, scorul APGAR/ reanimarea nou-născutului, coordonatele sale morfologice (greutate, talie, perimetru cranian).

Din analiza acestor date se pot reţine o serie de *„semnale de alarmă"*, utile în analizele ulterioare (vezi secţiunea A.5.5).

(2) Anamneza neonatală este la fel de importantă, deoarece dificultăţile în adaptarea copilului la viaţa extrauterină sau o serie de manifestări anormale *pot semnala* malformaţii şi/sau malfuncţii congenitale. Dintre acestea menţionăm: crize de apnee, dificultăţi de supt, vărsături, hipotonie, convulsii, cianoză, icter prelungit.

(3) Anamneza postnatală – vizează evaluarea creşterii, a dezvoltării psihomotorii şi sociale (achiziţii motorii, comportament, limbaj, performanţe etc.), bolile copilăriei şi – atunci când este cazul – ale dezvoltării pubertare.

(4) Istoricul bolii pacientului: momentul debutului, manifestări, evaluări clinice şi paraclinice, îngrijiri medicale etc. Dar, atenţie, ar fi o mare greşeală să ne limităm la anumite elemente; trebuie puse întrebări specifice despre funcţionarea tuturor organelor (*„revista sistemelor"*) pentru identificarea unor elemente corelate cu boala de bază.

b) Anamneza familială

(1) *Definiţii, importanţă, condiţii*

Anamneza familială reprezintă, în esenţă, o sumă de informaţii despre relaţiile biologice şi sociale/legale, despre starea fizică şi mentală a indivizilor familiei, precum şi despre funcţia lor reproductivă. Aceste informaţii se înregistrează şi se reprezintă grafic într-o

BCU - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

formă standardizată denumită **arbore genealogic** (în engleză, *pedigree*).

Orice manual de semiologie subliniază utilitatea istoricului familial *direcţionat* (a antecedentelor familiale sau eredo-colaterale) ca etapă primară a evaluării bolnavului şi orice foaie de observaţie folosită în clinică are o secţiune distinctă pentru acest istoric familial. Deseori această acţiune este „expediată" prin câteva întrebări banale şi, în rubrica corespunzătoare, se scrie „nimic de semnalat". Această atitudine reflectă grabă, superficialitate sau, poate, o minimalizare a problemei; un celebru profesor de semiologie spunea *„a nu reuşi să iei un istoric familial corect este o practică medicală rea, care uneori poate fi o neglijenţă criminală"* (Child, 1982). Într-adevăr, anamneza familială poate furniza informaţii decisive pentru: diagnosticul medical, decizia strategiilor de testare, stabilirea modului de transmitere, determinarea riscului de recurenţă, identificarea persoanelor cu risc genetic crescut etc.

Datorită importanţei sale, anamneza familială necesită o *tehnică perfectă* (inclusiv în realizarea unei bune colaborări cu familia pacientului), *acurateţe, timp* şi *eficienţă*. Aceste raţiuni ne determină să prezentăm mai pe larg metodologia anamnezei familiale şi a construirii unui arbore genealogic. Vom face însă, mai întâi, câteva precizări generale.

- Realizarea unui istoric familial se face de obicei de către medicul consultant printr-un *interviu „faţă în faţă"* (cu pacientul sau părinţii săi, dacă este copil), într-o ambianţă confortabilă, fără elemente perturbatoare, care să asigure confidenţialitatea relatărilor.
- *Arborele genealogic* începe în mod obişnuit cu individul care solicită consultaţia genetică (pentru evaluare, sfat sau testare genetică) şi care poate fi sau nu afectat; el se numeşte **consultand**. Pentru prima persoană bolnavă care aduce familia în atenţia medicală se foloseşte termenul **proband** (denumit şi *propositus* sau *caz index*, mai ales în lucrări ştiinţifice). Deseori consultandul şi probandul sunt una şi aceeaşi persoană, dar în familie pot fi mai mulţi consultanzi.
- Efectuarea arborelui genealogic este o componentă a evaluării medicale ce devine *document medical*; de aceea se va face cu cerneală[2], pentru a fi permanentă, pe o hârtie „oficială" şi într-o formă standard (de obicei, A4, în lung, cu antet).

În antet se vor preciza: serviciul, numărul „fişei de consult genetic", data, numele şi prenumele consultandului/probandului, numele persoanei care relatează datele şi al examinatorului, motivaţia consultului, eventual etnia şi existenţa consangvinităţii, precum şi legenda simbolurilor particulare sau a abrevierilor.

Vom sublinia foarte clar că realizarea unei reprezentări corecte, precise şi uşor de interpretat este *nu numai o obligaţie, ci şi o probă de profesionalism.*

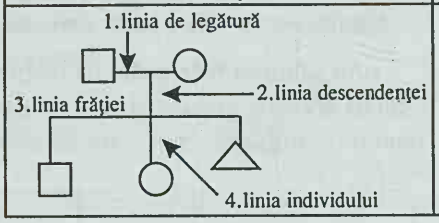
	Masculin	Feminin	Sex Necunoscut
Individ (sex fenotipic)	n. 1925	30	41
Bolnav (semnele se vor defini în legendă)			
Bolnav (cu mai multe afectări)			
Mai mulţi copii, număr cunoscut	5	5	5
Mai mulţi copii, număr necunoscut	n	n	n
Decedat	d. 35z	d. 41	
Născut mort (n.m.)	nm 28 spt.	nm 30 spt.	nm 34 spt.
Sarcină (S)	UM: 1/7/94	P 20 spt.	P 16 spt.
Avort spontan (AVS), sarcină ectopică (ECT)	masculin	feminin	ECT
Avort afectat	masculin	feminin	16 spt.
Terminarea sarcinii (TS)	masculin	feminin	ECT
Terminarea unei sarcinii anormale	masculin	feminin	12 spt.
Consultand	n. 24/4/59	35 ani	
Proband	P	P	

Figura 10.1. Simboluri standardizate pentru alcătuirea arborelui genealogic
(adaptat după Bennett RL *et al.*, 1995)

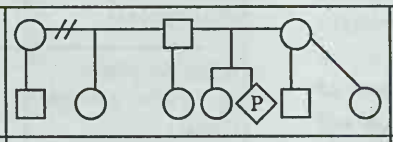
- *Istoricul familial* are o mare încărcătură psihologică şi emoţională, deoarece medicul pătrunde în esenţa vieţii individului şi membrilor familiei, a relaţiilor lor intime ce reflectă *o istorie umană unică*. Medicul trebuie să fie prudent, politicos, sensibil la unele aspecte culturale, etnice, religioase sau socioeconomice, foarte atent la credinţe şi obiceiuri. Obţinerea informaţiilor despre istoricul familial reprezintă însă o excelentă oportunitate pentru examinator de a stabili *o relaţie de încredere*

2. Unii preferă creionul şi radiera pentru corecţiile ce pot apărea în cursul relatării; în această variantă, la final se va redesena arborele genealogic în cerneală, cu atenţie pentru a nu omite date.

BCU "VICTOR BABEŞ" UNIVERSITY LIBRARY

Definiţii	Comentarii
	Dacă este posibil, partenerul masculin se va plasa la stânga partenerului feminin Fraţii vor fi listaţi în ordinea naşterii de la stânga la dreapta Pentru sarcinile care nu ajung la termen linia individului va fi mai scurtă

1. Linia de legătură (orizontală)

a. Legături		O întrerupere a liniei de legătură indică faptul că relaţia nu mai există
b. Cosangvinitate		Se va menţiona deasupra liniei gradul de înrudire (ex.: veri gr. III)

2. Linia descendenţei (verticală sau oblică)

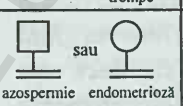
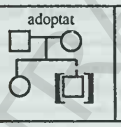
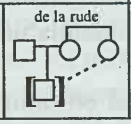
		Descendenţi din părinţi biologici		
- Gemeni	Monozigoţi	Dizigoţi	Necunoscut	O linie orizontală între simboluri indică gemeni monozigoţi
- Istoric familial necunoscut	?	?		
- Absenţa voluntară a copiilor				Se indică motivul, dacă este cunoscut
- Sterilitate				Se indică motivul, dacă este cunoscut
- Adopţie				Pentru a semnifica adopţia, se folosesc paranteze drepte. Părinţi sociali sau biologici sunt notaţi prin linie de legătură punctată sau plină

Figura 10.2. Definiţia liniilor folosite în întocmirea arborelui genealogic

(după Baker *et al.*, 1998)

cu pacientul şi/sau familia sa, de a face *observaţii psihologice* utile privind consultaţii: interacţiunea dintre cuplu şi familie, nivelul de stres al persoanelor, ideile şi miturile lor privind cauzalitatea bolii, sentimentul de vinovăţie, timiditate etc. Multe răspunsuri şi reacţii vor depinde de limbajul folosit şi de calitatea întrebărilor.

(2) *Simboluri şi informaţii standard folosite în realizarea arborelui genealogic*

Pentru construcţia arborelui genealogic se vor folosi simboluri şi abrevieri standardizate (figurile 10.1 şi 10.2).

- Un bărbat este desenat printr-un *pătrat* şi, dacă este posibil, se va plasa la stânga unei partenere, o femeie desenată printr-un *cerc*. Probandul şi consultandul vor fi obligatoriu identificaţi printr-o *săgeată*, însoţită de litera P pentru proband (figura 10.1).
- Relaţiile dintre indivizii familiei se marchează prin patru tipuri de linii (figura 10.2): *linia de legătură* uneşte doi parteneri; dacă s-a produs separarea lor, linia de legătură se va marca cu două liniuţe oblice, iar dacă partenerii sunt înrudiţi se va desena o linie dublă. *Linia descendenţei* merge vertical (sau oblic, dacă nu avem spaţiu suficient) până la *linia orizontală a fratriei*, din care se desprinde – pentru fiecare frate-soră – *linia individului*. Simbolurile pentru membrii din fiecare generaţie se desenează pe acelaşi rând, iar în fratrie de obicei în ordinea naşterii. Uneori, datele despre copiii sănătoşi se pot reda sintetic printr-un *număr* (echivalent cu numărul de fraţi sau numărul de surori) plasat în interiorul simbolului de sex masculin sau feminin.
- O sarcină în curs de evoluţie este simbolizată printr-un *pătrat* sau *cerc*, dacă se cunoaşte sexul, sau un *romb* (sex necunoscut) în care se scrie litera S (de la sarcină: unii preferă litera P, de la *pregnancy*); sarcinile care

BCUJ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

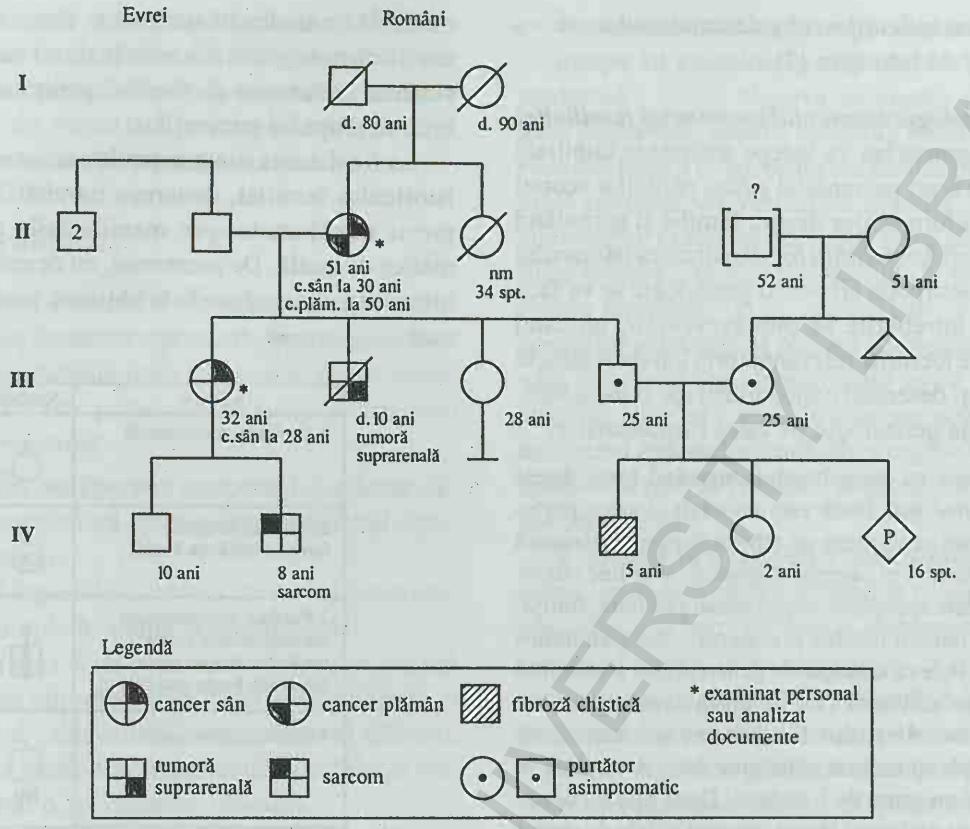


Figura 10.3. Arbore genealogic ipotetic ce demonstrează modul în care se scriu diferite tipuri de informaţii
(modificat după Bennett RL *et al.*, 1995)

se sfârşesc înainte de termen (avort spontan sau întrerupere) sunt reprezentate printr-un *triunghi* (sub care se scrie sexul, dacă se cunoaşte), iar linia individului va fi mai *scurtă*. În figura 10.2 sunt prezentate şi semnele pentru gemeni şi copii adoptaţi sau plasaţi în adopţie.

- Fiecare persoană afectată se va reda printr-un *simbol haşurat*; dacă sunt mai multe afecţiuni, simbolul va fi împărţit în *sectoare*, fiecare reprezentând o boală (figura 10.3); acelaşi sistem se foloseşte şi pentru afecţiunile cu expresivitate variabilă, dar în acest caz fiecare sector va corespunde unei manifestări clinice majore; în ambele cazuri semnificaţia fiecărui cadran se va menţiona în legendă.
- O linie diagonală ce trece printr-un simbol (pătrat, cerc, romb, triunghi) semnifică faptul că individul respectiv a *decedat*.
- Chiar dacă se folosesc simboluri standardizate, este obligatoriu să se includă pe foaia cu arborele genealogic o *legendă* care va cuprinde informaţiile necesare interpretării.

Arborele genealogic va cuprinde de asemenea o serie de *informaţii standard* despre persoanele incluse, notate clar, complet sau abreviat (tabelul 10.1). Dacă informaţiile nu sunt certe, este preferabil să se pună tilda (~), iar dacă nu se cunosc date despre istoricul

Tabelul 10.1. Informaţii incluse în arborele genealogic

– Vârsta/data naşterii sau anul de naştere a pacientului şi membrilor familiei sale
– Vârsta la deces şi cauza decesului; pentru nou-născuţii morţi se notează vârsta gestaţională
– Statusul pacientului: afectat/sănătos (definit în legendă prin umbrirea simbolului)
– Vârsta debutului bolii şi/sau diagnosticului bolii
– Caz evaluat personal sau documentat medical (*)
– Statusul testării (E – definit în legendă)
– Informaţii relevante pentru sănătate (de exemplu talie, greutate)
– Sarcină; se notează data UM sau VG (săptămâni)
– Complicaţiile sarcinii: avort spontan, sarcină ectopică, întreruperea sarcinii
– Infertilitate sau opţiune de a nu avea copii
– Etnia bunicilor
– Consangvinitate

BCU IAŞI / OVIDIUS UNIVERSITY LIBRARY

familial al ascendenților sau descendenților, se va pune semnul de întrebare (?).

(3) *Metodologia istoricului/anamnezei familial(e)*

Medicul genetician va începe anamneza familială explicând pe scurt pacientului și/sau părinților scopul și utilitatea informațiilor despre familie și garantând *păstrarea confidențialității lor*. Realizarea istoricului familial și construcția arborelui genealogic se va face pas cu pas; întrebările se pun *secvențial*, ghidând pacientul spre lucrurile relevante (prin întrebări directe și specifice) și desenând concomitent (pe o foaie standard) arborele genealogic pe baza răspunsurilor.

Se va începe cu consultandul, marcând toate datele precizate mai sus. Dacă este un adult și are o parteneră, aceasta se va trece pe arbore (ambii se plasează de obicei în centrul paginii). Urmează, în ordine cronologică, rudele apropiate: copiii și/sau sarcinile, fratria, părinții și bunicii paterni și materni – înregistrându-i pe aceeași linie ce corespunde generației lor și stabilind orice factor adițional care ar putea avea consecințe asupra evaluării riscului. Dacă despre unii ascendenți sau descendenți nu sunt suficiente date, se va pune în dreptul lor un semn de întrebare. Dacă este un copil, se vor marca părinții și fratria, iar apoi rudele de gradul doi și trei. Pentru fiecare membru al familiei se întreabă despre starea de sănătate. Întrebările despre starea de boală pot fi mai generale sau țintite, fie pentru fiecare sistem de organe, fie pentru anumite manifestări ale unei boli, atunci când există un diagnostic. Se va insista asupra: fondului etnic (țara de origine, naționalitatea familiei, religia), înrudirii/consangvinității și se va avea totdeauna în minte *posibilitatea non-paternității*, a unor parteneri multipli, a unor copii înfiați sau adoptați.

Este obligatorie *documentarea fiecărui caz de boală* (înregistrări medicale, rezultate de laborator, necropsie etc. – obținute cu consimțământul scris al pacienților) și eventual *evaluarea* lui directă de către medicul consultant; toate datele vor fi trecute/anexate ordonat în fișa de consult. În aceste situații documentate, pentru a le deosebi de cele relatate (din amintiri) de către consultand sau familie, cazul se va marca cu asterisc (*). Evaluările clinice sau testele (de exemplu, CT/RMN, cariotip, teste moleculare) se notează cu litera **E** (de la „evaluare"); dacă s-au făcut mai multe evaluări, acestea se vor nota cu E_1, E_2; se poate menționa rezultatul: normal „–" sau anormal „+" sau „ns" (nesemnificativ/non-informativ) (figura 10.4).

La încheierea interviului, medicul trebuie să-i dea „o șansă în plus" interlocutorului pentru relatarea unor situații particulare („*...există altceva despre care nu v-am întrebat și pe care dumneavoastră credeți că este important ca eu să-l știu?*"), și pentru cazurile de boală (mai ales în sindroame dismorfice, a căror manifestare se poate schimba în timp) va solicita consultarea „*albumului de familie*" pentru a urmări evoluția fenotipului pacienților.

La finalizarea diagnosticului *se va reveni* asupra istoricului familial, deoarece întrebările pot fi mai precis direcționate spre manifestările oligosimptomatice de boală. De asemenea, cu ocazia evaluărilor ulterioare, datele familiale obținute vor fi *reactualizate.*

Definiție	Simbol
1.Evaluare documentată	
2.Purtător obligator (nu va manifesta boala)	
3.Purtător asimptomatic/ presimptomatic (clinic neafectat, dar va putea manifesta boala mai târziu)	
4.Studiu neinformativ	Eu
5.Individ afectat cu evoluare pozitivă	E+

Figura 10.4. Prezentarea în arborele genealogic a informațiilor privind evaluările genetice și testele genetice
(după Benett, 2000)

(4) *Interpretarea anamnezei familiale și analiza arborelui genealogic*

Anamneza familială poate fi:

- *pozitivă*[3] – atunci când sunt identificate și alte persoane afectate;
- *negativă, dar informativă* – pacientul este singurul bolnav, dar unele date sunt utile: vârsta părinților (a bunicului patern pentru bolile legate de X), existența consangvinității etc.;
- *negativă și neinformativă* – fie prin lipsa cunoștințelor despre familie, tehnică neadecvată, alte cauze (abateri de la paternitate, mutații noi sau fenocopii, boli recesive sau multifactoriale etc.), fie pur și simplu pentru că pacientul este un caz sporadic.

Geneticianul trebuie să interpreteze cu grijă datele sintetizate în arborele genealogic al familiei pentru *a stabili corect riscul de recurență și persoanele cu*

3. Termenii de „anamneză *pozitivă*" și „anamneză *negativă*" au de fapt o semnificație inversă, ce poate deruta uneori pacientul. Ar fi de preferat evitarea celor două adjective, eventual printr-o perifrază.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

risc. Pentru aceasta va lua în calcul toate modalitățile de transmitere ereditară şi va fi foarte atent la fenomenele de expresivitate variabilă, penetranță (inclusiv dependentă de vârstă) şi heterogenitate genetică (descrise în detaliu în capitolul 6.D).

5.3. Examenul fizic

Examenul fizic este decisiv în genetica medicală şi dismorfologie, deoarece reprezintă, împreună cu istoricul medical, temelia unui diagnostic clinic corect şi complet. El este *prima probă a calificării unui clinician şi necesită*:

- *condiții optime* (pacient cooperant şi relaxat, lumină şi temperatură optime, iar pentru copii – prezența mamei);
- o *tehnică impecabilă*, ce include o evaluare metodică şi completă, atentă şi minuțioasă;
- abilitatea de a fi un *observator priceput*; această abilitate se obține în timp, fiind atent la detalii şi dezvoltând „simțurile" (de apreciere a) mărimii, proporției, poziției şi simetriei (dismorfologia este în principal o *specialitate vizuală*);
- *un fond de cunoştințe bazale*, reprezentat de cunoaşterea morfologiei şi înțelegerea morfogenezei normale şi anormale.

Evaluarea genetică medicală se bazează pe examinarea fizică standard a copilului sau adultului, dar conține anumite elemente particulare, generate de prezența dismorfiilor produse de tulburări ale procesului de morfogeneză.

a) Examinarea generală

Componentele de bază ale examinării fizice generale a unui bolnav sunt:

- determinarea *parametrilor de creştere* (talie, greutate, perimetru cranian), habitusul general al corpului şi proporțiile sale;
- evaluarea generală a stării de sănătate şi statusului nutrițional;
- examinarea metodică a *sistemelor şi structurilor anatomice*; ordinea examinării poate varia în funcție de vârsta pacientului şi acuzele principale, dar esențial este ca examenul să fie complet.
- evaluarea semnelor vitale (frecvență cardiacă, respiratorie, presiune arterială);

b) Examenul clinic/dismorfologic

Are ca obiectiv *recunoaşterea formelor anormale* (dismorfii) şi deci identificarea tuturor anomalii majore sau minore ce pot realiza un *model* caracteristic.

Evaluare clinică va fi completă şi minuțioasă. Se va începe cu examinarea segmentelor şi regiunilor anatomice; se vor observa cu atenție *forma, mărimea, proporțiile, poziția, conturul, pliurile, spațierea, simetria* tuturor elementelor anatomice (a căror morfologie normală, cu variantele descrise, trebuie bine cunoscută). O atenție deosebită se va acorda anomaliilor minore – modificări subtile ale unor structuri. Pentru începători (şi nu numai) este utilă *o listă de semne* pe segmente şi regiuni. Inspecția loco-regională a *structurilor de suprafață* se va completa cu palparea lor şi cu o serie de manevre active. Urmează examenul aparatelor, inclusiv a organelor de simț şi sistemului nervos (examen neurologic) şi muscular, uneori ignorate.

Evaluarea va fi *calitativă* (absent/prezent – detalii) şi/sau *cantitativă* pentru structurile ce pot fi *măsurate obiectiv* (cu tehnici corecte şi instrumente adecvate) pentru a constata (prin comparație cu standardele de vârstă şi sex) o deviere semnificativă (> ± 2DS) de la normal. Vom preciza totuşi că nici un set de măsurători nu va înlocui gândirea clinică în determinarea prezenței şi semnificației variațiilor morfologice.

Un mijloc prețios de obiectivare şi comparare este *fotografia clinică* de foarte bună calitate (digitală), precum şi înregistrarea video, obligatorii pentru dismorfologi; imaginile sunt mai bune decât orice descriere detaliată.

Examinatorul va acorda o atenție deosebită *fenotipului comportamental*: expresia facială, activitatea motorie (mişcări neobişnuite), limbajul, reacții la stimuli etc.

Vom menționa că abordarea clinică a diferitelor situații particulare (macrocefalia/microcefalia, statura mică, displaziile scheletice, copilul „moale", ambiguitățile genitale, retardul mental etc.) necesită o metodologie adecvată, prezentată în cărțile de Genetică clinică[4].

O situație particulară o reprezintă *examenul fizic al nou-născutului mort*.

> În acest caz, se vor parcurge următoarele etape: stabilirea vârstei gestaționale; măsurarea taliei, greutății, perimetrului cranian; examinarea fetusului, a cordonului ombilical (posibilitatea existenței unei artere ombilicale unice) şi a placentei (mare, mică, prezența altor modificări); fotografierea generală şi pe segmente; efectuarea unei radiografii a întregului corp (*bebigramă*); necropsia sistematică şi atentă efectuată de către un fetopatolog; puncția cardiacă (permite prelevarea unei cantități de sânge) sau biopsia cutanată, în vederea efectuării unui cariotip (având în vedere că 20% din

4. Recomandăm o carte foarte utilă pentru toți cei confruntați cu consultul genetic: Firth HV, Hurst JA, Hall JG. *Oxford desk reference – Clinical genetics*. Oxford University Press, 2005

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cazuri sunt cauzate de boli produse de anomalii cromozomiale) sau a unor analize ADN.

c) Înregistrarea şi sinteza datelor. Plan de investigaţii

În finalul evaluării, datele obţinute se vor înregistra corect, cu multă grijă, într-o „fişă de consult genetic" – cu o structură standard care să faciliteze culegerea şi descrierea lor. Anomaliile vor fi *descrise precis* (folosind termenii dismorfologiei) şi se va menţiona clar care dintre elemente sunt *certe* sau *probabile*. Se va face *o sinteză primară a datelor obţinute*, stabilind care sunt anomaliile majore şi minore, precum şi distribuţia lor pe segmente şi/sau regiuni ale corpului. Pe această bază se vor formula mai multe *opţiuni posibile de diagnostic*. Acest lucru este necesar pentru a se va întocmi un *plan individual* de examene clinice de specialitate şi explorări paraclinice, care să valideze şi nuanţeze elementele identificate la examenul fizic şi să permită o diferenţiere între opţiunile diagnostice.

d) Informarea părinţilor

La activităţile consultaţiei iniţiale (anamneză, examen fizic) se vor adăuga obligatoriu acţiuni de *susţinere psihologică şi sfat* medical al părinţilor/cuplului/bolnavului. Nu trebuie să uităm că ei traversează o criză psihologică şi de aceea chiar de la acest prim contact ar trebui *să se înceapă procesul de consiliere*, care va evolua şi se va dezvolta odată cu acţiunile de diagnostic şi îngrijire a bolnavului.

La sfârşitul evaluării, medicul trebuie să prezinte – într-o formă simplă şi accesibilă – o schiţă a problemelor identificate (anomalii, semne, simptome) şi un plan de evaluare medicală şi îngrijire (management), fără un diagnostic detaliat sau informaţii despre riscul de recurenţă. Este adevărat că părinţii sunt nerăbdători, dar trebuie explicat, cu prudenţă şi delicateţe, că *diagnosticul nu este de obicei o urgenţă şi cere timp*; din aceste motive se recomandă un „diagnostic preliminar" cu descrierea anomaliilor şi o opinie rezervată asupra diagnosticului final. Chiar dacă procesul de diagnostic nu s-a încheiat, este bine ca medicul consultant *să informeze şi în scris* pacientul/părinţii asupra rezultatelor evaluării săi, precum şi medicul care a trimis cazul asupra rezultatelor evaluării.

5.4. *Alte examene clinice şi explorări paraclinice*

Datele obţinute prin anamneză şi examen clinic trebuie deseori *validate* şi *confirmate* prin expertiza altor medici specialişti (colaboratori „antrenaţi" în studiul patologiei genetice şi malformative în specialitatea lor) şi a unor explorări paraclinice.

Medicul genetician este, am mai spus acest lucru, *un „soi de generalist"* care, evident, nu are priceperea unui specialist în evaluarea şi explorarea completă a unui organ. De aceea, el va solicita colaborarea altor specialişti şi apoi va fi responsabil *de colectarea* şi *integrarea unitară a tuturor datelor obţinute de el* prin anamneză şi examen fizic, precum şi ale acelora ce provin din alte evaluări clinice sau paraclinice.

- Examenele clinice de specialitate vor fi ghidate printr-o *trimitere* ce va cuprinde elementele semnificative şi, eventual, supoziţiile de diagnostic, precizând – acolo unde este cazul – ce anume se urmăreşte.
- Testele funcţionale (hepatice, renale, hematologice, metabolice, echilibrul acido-bazic şi electroliţii etc.) vor corespunde (ţintit) modificărilor/anomaliilor înregistrate.
- Evaluările radiografice, în special ale scheletului (vârsta osoasă, mărimea craniului, lungimea oaselor lungi, lungimea oaselor mâinii etc.), sunt necesare pentru diagnosticul displaziilor scheletice şi sindroamelor cu anomalii congenitale osoase.
- Studiile imagistice speciale – ecografie, ecocardiografie Doppler, CT, RMN – vor fi bine motivate şi „ţintite" pe anumite organe. Trebuie să subliniem că imagistica (printr-o gamă largă de explorări) completează anatomia de suprafaţă a dismorfologului cu o *anatomie de profunzime* şi este decisivă pentru anumite categorii de sindroame.

5.5. *Analiza şi interpretarea datelor*

Uneori, **diagnosticul este instantaneu**[5] deoarece multe sindroame au un aspect stereotip care permite o recunoaştere rapidă, un diagnostic vizual şi mental imediat (de exemplu, sindromul Down, acondroplazia ş.a.). Acest tip de diagnostic se bazează pe abilitatea naturală a omului de a fixa imaginile (în special cele faciale) în memorie şi de a le evoca (aminti) când este necesară o comparare şi o recunoaştere. Dismorfologii nu fac de obicei eforturi speciale de memorare vizuală, ci mai curând *descompun* imaginile pacientului în elemente fizice individuale şi apoi *le recompun* într-un model unic, specific unui sindrom.

> Recunoaşterea instantanee necesită o experienţă dobândită în timp şi poate duce frecvent la erori fie din cauza manifestării variabile a sindroamelor, fie datorită tentaţiei de a pune un diagnostic rapid (înainte de a se finaliza o evaluare completă a pacientului sau ignorând unele elemente clinice semnificative).

5. Pentru diagnosticul instantaneu al unor sindroame se foloseşte, pe toate meridianele, un cuvânt derivat din germană – *gestalt*.

BUJAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

De cele mai multe ori **diagnosticul este analitic**, bazându-se pe *analiza şi interpretarea datelor* anamnestice, clinice şi paraclinice referitoare la un pacient sau cuplu care solicită un consult genetic. Această *abordare interpretativă* orientează diagnosticul spre o anumită categorie de boli/sindroame genetice şi spre una sau câteva entităţi. Acţiunea cere timp pentru ca medicul să *adune* datele, să le *valideze* (documenteze) şi *ordoneze*, iar apoi, pe baza unei analize logice, să le *interpreteze*, să încerce să le explice şi coreleze. Practic, sindromologul trebuie să-şi explice ce observă. Diagnosticul necesită nu numai informaţii, ci şi cunoştinţe, capacitate de analiză şi sinteză, experienţă.

a) Colectarea şi ordonarea datelor trebuie să se finalizeze cu stabilirea unor *„elemente de alarmă"* (tabelul 10.2), precum şi a anomaliilor/simptomelor *certe şi probabile*. Ele vor fi notificate pe o pagină distinctă a dosarului clinic al pacientului.

Tabelul 10.2. Semne de alarmă pentru existenţa unor malformaţii congenitale şi/sau sindroame plurimalformative

Vârstă maternă avansată (pentru anomaliile cromozomiale)
Vârsta paternă avansată (pentru mutaţii noi)
Avorturi spontane repetate
Anamneză familială semnificativă
Prezentaţie pelvină
Perturbarea creşterii intrauterine a capului (de exemplu, microcefalie, evaluată prin ecografie)
Retard sau accelerare de creştere postnatală
Creştere disproporţionată (de exemplu, membre scurte)
Obezitate precoce
Anomalii minore multiple
Microcefalie
Întârziere în dezvoltarea psihomotorie sau retard mental, asociată sau nu cu fenomene neurologice (spasticitate) sau psihice (autism)
Hipotonie ± contracturi (artrogripoză)
Laxitatea (articulară, cutanată) a ţesutului conjunctiv
Afectare scheletică, senzorială, plurivisceralâ

b) Interpretarea datelor se va face prin prisma proceselor embriologice (perioadă cronologică de producere, tipuri şi corelaţii între anomalii, mecanism de producere ş.a.) şi a datelor genetice (categorii etiologice) – în mai multe etape, folosind eventual un algoritm de diagnostic.

(1) Se va începe cu stabilirea precisă a existenţei unei *anomalii congenitale izolate (unice) sau a unor anomalii multiple* (tabelul 10.3). Acţiunea este decisivă pentru diagnosticul final şi depinde de *calitatea examenului fizic* (evidenţierea şi înregistrarea tuturor anomaliilor minore), precum şi de *identificarea secvenţelor* şi a *defectelor de câmp de dezvoltare* care, deşi se prezintă sub forma unor anomalii multiple, reprezintă din punct de vedere patogenic defecte unice (vezi capitolul 15).

> Secvenţa reprezintă o singură anomalie iniţială care determină secundar alte anomalii (de exemplu, în *secvenţa Robin*, hipoplazia mandibulei determină secundar despicătură palatină şi glosoptoză). Defectul de câmp de dezvoltare se produce prin afectarea (din cauze diferite) a unei singure unităţi embrionare („câmp") din care rezultă structuri diferite, dar vecine (de exemplu, spectrul de anomalii ale *holoprozencefaliei*); mulţi autori consideră că *secvenţele* şi *defectele de câmp embrionar* reprezintă în fond acelaşi lucru.

(2) *Anomaliile congenitale izolate* trebuie diferenţiate în *anomalii majore* şi *anomalii minore* (fără semnificaţie medicală sau cosmetică), iar acestea din urmă trebuie deosebite de *variantele familiale*. De precizat că:

- *anomaliile majore* nu sunt mai importante pentru diagnostic decât cele minore; ele sunt doar mai evidente şi mai grave, atrăgând mai rapid atenţia medicului;
- *anomaliile minore* (ce trebuie bine cunoscute şi căutate) pot semnala existenţa unei anomalii majore neidentificate şi pot constitui repere preţioase pentru diagnostic.

(3) *Anomaliile majore izolate* vor fi clasificate patogenic în anomalii primare (malformaţii şi displazii) sau secundare (disrupţii şi deformaţii):

- *anomaliile primare* se produc precoce (embriopatii) printr-un proces primar şi intrinsec de dezvoltare anormală: fie a unor componente anatomice (de exemplu, anencefalia, polidactilia, agenezia renală ş.a.), fie a ţesuturilor din care sunt formate (de exemplu, osteo-condro-displazii);
- *anomaliile secundare* – se produc *tardiv* (fetopatii), pe structuri *normal formate*, care sunt deformate (de exemplu, piciorul strâmb) sau distruse (de exemplu, atrezia intestinală sau amputaţiile congenitale) pe parcursul dezvoltării embrio-fetale.

Includerea unei anomalii congenitale majore în una dintre cele patru categorii (malformaţii, disrupţii, deformări, displazii) are valoare prognostică şi pentru stabilirea riscului de recurenţă. Dificultatea majoră este reprezentată de faptul că un anumit tip de anomalie poate fi produsă prin mecanisme diferite şi cauze diferite (vezi capitolul 15).

(4) *Anomaliile congenitale multiple* (majore şi/sau minore) pun cele mai dificile probleme de diagnostic, deoarece ele pot forma sindroame specifice, asociaţii sau combinaţii întâmplătoare de anomalii congenitale care individual sunt frecvente. Pentru a

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 10.3. Categorii de anomalii congenitale

Categorie	Subcategorie	Definiție	Exemple
Defecte izolate			
Variante normale		Prezente la >4% din populație.	Pete mongoliene
Anomalii		Deviații de structură, formă și/sau funcție care sunt considerate anormale.	
	Anomalii majore	Anomalii cu consecințe medicale, chirurgicale sau cosmetice.	Despicătură palatină
	Anomalii minore	Efect minim asupra sănătății individului; utile în diagnostic.	Urechi jos plasate
	Malformații	Defecte morfologice produse printr-un proces primar și intrinsec de dezvoltare anormală.	Aplazie radială
	Displazii	Organizarea anormală a celulelor în țesuturi.	Hemangioame
	Disrupții	Distrugerea extrinsecă a unei structuri normal formate.	Bride amniotice
	Deformații	Formă sau poziție anormală a unei părți a corpului produsă prin forțe mecanice.	Picior strâmb
	Secvențe	O combinație de anomalii ce derivă dintr-o singură anomalie inițială sau este produsă de factori mecanici.	Secvența malformativă Pierre Robin Secvența deformativă Potter
	Defecte de câmp de dezvoltare	O unitate de morfogeneză (un set de primordii embrionare) ce reacționează identic la cauze diferite, producând mai multe anomalii.	Spectrum holoprosencefalic
Defecte multiple	Sindrom	Anomalii multiple considerate a fi etiopatogenic corelate și care nu reprezintă o secvență.	Sindrom Down Sindrom Marfan Sindrom Zellweger
	Asociație	Întâlnirea neîntâmplătoare la unul sau mai mulți indivizi a mai multor malformații ce nu sunt identificate ca fiind o secvență sau un sindrom.	Asociația VA(C)TER(L)

stabili un diagnostic de grup sau de tip sunt utile o serie de acțiuni „interpretative".

- *Stabilirea momentului ontogenetic de producere* (debutul) a anomaliilor prezente la pacient permite (printr-o serie de date anamnezice sau fizice) deosebirea defectelor prenatale (prin erori de morfogeneză) de cele perinatale sau postnatale.
  - *Defectele prenatale* se pot produce fie în perioada de blastogeneză (2-4 săptămâni după fecundare), când afectează întregul embrion, producând malformații majore multiple (de exemplu, VACTERL), fie în săptămânile 5-8, când afectează numai anumite organe – în funcție de orarul lor embriologic – și produc malformații majore izolate. După săptămâna a 9-a, când majoritatea regiunilor și organelor sunt deja formate, este alterată *reglarea fină* a edificării structurilor embrionare și apar *anomalii minore.*
  - *Defectele perinatale* se produc spre sfârșitul sarcinii, în cursul travaliului/nașterii sau postpartum prin *alterări hipoxice* care se însoțesc secundar de microcefalie, contracturi, deficiențe de creștere, hipertricoză.
  - *Defectele postnatale* apar la un *copil născut normal conformat,* la o anumită perioadă după naștere, ca urmare a unor evenimente acute sau cronice care schimbă morfologia și alterează progresiv statusul neurologic și diferite organe (de exemplu, mucopolizaharidozele). De subliniat că în multe sindroame (mai ales displazice) unele componente definitorii pentru diagnostic apar *la perioade diferite de viață* (de exemplu, sindroamele Bardet-Bidel, NF-1, Marfan).
- Determinarea *distribuției anatomice* a anomaliilor multiple permite orientarea spre anumite diagnostice (de exemplu, sindroamele oto-palato-digital, velo-cardio-facial, oro-facio-digital etc.) și permite căutarea lor în bazele de date informatizate sau atlase.
- Identificarea unor *modificări clinice* ce pot evoca existența unor sindroame (tabel 10.2).
- Stabilirea *relațiilor etiopatogenice* dintre anomaliile congenitale multiple și încadrarea lor într-un sindrom sau asociație (vezi tabelul 10.3 și capitolul 15).
  - Un *sindrom dismorfic* sau plurimalformativ este o combinație caracteristică de anomalii congenitale majore și minore observate împreună, într-un mod predictibil, la mai mulți pacienți în familii diferite

BCU "IULIU HAȚIEGANU" UNIVERSITY LIBRARY

şi, uneori, în aceeaşi familie; ele au foarte probabil o cauză sau un mecanism comun de producere (pe această bază se deosebesc: sindroame cromozomiale, necromozomiale sau teratogene). Elementele componente sunt nespecifice (pot fi prezente şi în alte sindroame şi pot avea cauze diferite) şi rareori una dintre anomalii duce la diagnostic; combinaţia este unică, şi nu părţile sale.

- *Asociaţiile* sunt combinaţii neîntâmplătoare ale mai multor malformaţii majore, ce nu au o cauză comună evidentă care să ducă la un model predictibil; exemple: VACTERL, CHARGE sau MURCS. Spre deosebire de sindroame, asociaţiile nu includ anomalii minore şi prezintă o mare variabilitate clinică, diagnosticul afirmându-se ori de câte ori găsim la un pacient cel puţin 2-3 dintre elementele componente.

(5) *Încadrarea bolnavului într-o categorie diagnostică* este rezultanta acţiunilor de analiză şi interpretare a datelor pacientului (vezi tabelul 10.3). Aşa cum am precizat, problemele sunt dificile în cazul unor anomalii multiple, deseori minore, asociate cu tulburări de creştere şi dezvoltare.

Pentru a se ajunge la opţiuni adecvate de *diagnostic specific* se pot folosi *algoritmi* (caseta 10.2) şi *chei de diagnostic*. Foarte utilă este *identificarea/selectarea câtorva semne „utile" sau evocatoare* [primare, calitative (discontinue), mai rare (prezente într-un număr mic de sindroame), care nu sunt variante normale (populaţionale/familiale)]; cu aceste semne „bune", ce pot avea o semnificaţie diagnostică, se va încerca *consultarea* cărţilor/literaturii de specialitate (o acţiune ce poate fi deseori foarte eficace), a bazelor de date electronice (POSSUM, OMD, Orphanet, GeneClinic, OMIM etc.) şi altor colegi care au fiecare experienţa lor personală şi poate au mai văzut cazuri asemănătoare.

Pe baza datelor şi cunoştinţelor dobândite se încadrează cazul într-o anumită categorie, (în funcţie de care se vor stabili testele genetice necesare):

- boală genetică, sindrom, asociaţie;
- sindrom malformativ, disruptiv, deformativ sau displazie;
- sindrom cromozomial, monogenic (mendelian), poligenic, teratogen, de cauză necunoscută;
- subgrup particular de sindroame malformative caracterizat printr-un element major: sindroame cu hipostatură sau talie înaltă, sindroame cu obezitate, sindroame cu contracturi sau cu laxitate articulară, sindroame cu despicături palatine, displazii scheletice etc.

5.6. Explorări (teste) genetice

O valoare deosebită pentru diagnosticul final o au, desigur, **testele genetice**: analize cromozomiale, probele biochimice şi testele bazate pe studiul ADN (vezi secţiunea următoare). Acestea pot fi planificate după examenul fizic al pacientului sau, mai bine, după ce s-au adunat toate datele şi se stabilesc elementele ce pledează pentru o boală cromozomială, o boală metabolică sau o boală monogenică.

Ţinând cont de caracterul „decisiv" al acestor teste, trebuie să subliniem că laboratoarele care le realizează trebuie să fie acreditate, să folosească tehnici standardizate şi să fie incluse într-un control extern de calitate.

Medicul consultant, care planifică şi solicită teste genetice, trebuie:

- să cunoască bine *indicaţiile şi limitele testelor*; vom preciza că nu există teste pentru fiecare boală sau sindrom plurimalformativ (şi în acest caz clinica este „suverană"), precum şi faptul că fiecare metodă are limitele ei;
- să ştie *ce produs biologic* trebuie să recolteze, modalitatea de obţinere şi stocare, modul şi mijloacele de trimitere la laborator;
- să obţină un *consimţământ informat scris* al pacientului/părinţilor, îndeosebi pentru testele presimptomatice (şi în special la copii) sau prenatale (vezi capitolul 21);
- să asigure *confidenţialitatea* rezultatelor şi utilizarea lor numai cu acordul persoanei.

5.7. Finalizarea consultului genetic

La finalul etapelor descrise mai sus, medicul genetician va trebui: (1) să formuleze un diagnostic specific şi un prognostic; (2) să întocmească un plan de urmărire/îngrijire a bolnavului (ce va include şi posibilităţile de recuperare, prevenire a complicaţiilor); şi (3) să stabilească riscul genetic de recurenţă, precum şi eventualele opţiuni reproductive ce ar putea evita acest risc.

Acurateţea şi precizia unui **diagnostic clinic şi etiologic** sunt esenţiale, deoarece acesta nu este numai „o sentinţă pentru o viaţă", ci şi un element care influenţează hotărâtor o serie de decizii:

- *identificarea unor malformaţii oculte*, neevidente la evaluarea iniţială; un diagnostic corect implică o căutare atentă a unor malformaţii viscerale asociate sindromului (de exemplu, anomaliile renale în sindromul Turner sau sindromul velo-cardio-facial);
- *prognosticul*;
- *alegerea unor opţiuni terapeutice*, chirurgicale (dacă sunt posibile) sau medicale (de exemplu, extirparea gonadelor în sindromul Turner sau în disgenezia gonadică mixtă, când există o linie XY, ori corectarea hipoglicemiei în sindromul Beckwith-Wiedemann pentru a preveni convulsiile şi alterarea creierului);
- *urmărirea atentă a pacientului* pentru evitarea unor complicaţii (de exemplu, evaluarea periodică ecocardiografică a diametrului inelului aortic la pacienţii cu sindrom Marfan);

CASETA 10.2

Algoritm de diagnostic în anomaliile congenitale multiple
(adaptat după: Aase, 1992; Wilson, 2000)

1) *Pacientul are o anomalie structurală?*
   - *NU* → continuarea diagnosticului *NON*-sindromologic!
   - *DA*
   ↓
2) *Sunt prezente anomalii multiple?*
   - *NU* → *Anomalia izolată este majoră?* *NU* → liniştirea părinţilor!
   - *DA* *DA* → terapie adecvată, sfat genetic (risc mic)
   ↓
3) *Toate anomaliile sunt minore?*
   - *DA* → *Se caută o malformaţie majoră ocultă* → *A fost găsită?* *NU* →liniştirea părinţilor!
   - *NU* → *pacientul are ACM majore şi minore* ← *DA*
4) *Sunt implicate mai multe ţesuturi?*
   - *DA* → *Se caută o displazie* → terapie adecvată, prognostic, sfat genetic
   - *NU*
   ↓
5) *Este o anomalie disruptivă ?*
   - *DA* → *Se caută etiologia teratogenă a disrupţiei* → terapie, sfat genetic (risc mic)
   - *NU*
   ↓
6) *Există o deformaţie a unei regiuni anatomice?*
   - *DA* → *pacientul are o secvenţă sau un sindrom cu deformaţii* →
     → *A fost raportat oligohidramnios?*
     - *NU* → *Au existat cauze de compresie intrauterină?*
       - *DA* → *Urmărire, sfat reproductiv, prognostic bun şi risc de recurenţă mic*
       - *NU* → *Este prezentă hipotonia?*
         - *DA* → *posibil o artrogripoză neurologică sau miopatică* → *consult neurologic*
         - *NU* ↓
     - *DA* → *Există o anomalie reno-urinară?*
       - *DA* → *posibil o secvenţă deformativă idiopatică* → *liniştirea părinţilor, recuperare, urmărire*
       - *NU* → *terapie de sprijin, sfat genetic*
   - *NU* → *pacientul are malformaţii multiple ± deformaţii/disrupţii*
   ↓
7) *Una dintre malformaţiile primare produce secundar alte anomalii (secvenţă)?*
   - *DA* → *posibil o secvenţă malformativă* → *terapie adecvată, prognostic bun, sfat genetic*
   NU
   ↓
8) *A fost recunoscut un sindrom dismorfic?*
   - *DA* → *± confirmare de laborator* → *terapie adecvată, prognostic, sfat genetic*
   - *NU*
   ↓
9) *Analiza literaturii sau a bazelor de date informatizate; se stabilesc 1-3 semne/anomalii „cardinale" (de obicei mai rare, ce pot fi definite mai specific) ce vor constitui „puncte de intrare"*
   ↓
10) *A fost recunoscut un sindrom dismorfic?*
   - *DA* → *± confirmare de laborator* → *terapie adecvată, prognostic, sfat genetic*
   - *NU* → *sfatul altor specialişti*
     Reevaluare periodică a pacientului.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- *sfatul genetic* şi riscul de recurenţă în familie;
- opţiunile reproductive, inclusiv diagnosticul prenatal.

Nu în ultimul rând, un diagnostic specific este benefic pentru liniştea pacienţilor şi/sau a familiei (care va înţelege şi va accepta mai uşor „handicapul genetic" şi va dezvolta o atitudine realistă şi pozitivă).

În fiecare caz şi mai ales în sindroamele plurimalformative:

- *se va valida diagnosticul*, comparând din nou datele bolnavului cu cele din literatură/bazele de date de specialitate (ambele obligatorii în dotarea unui dismorfolog), existând obligaţia de identificare mai întâi a prezenţei caracterelor mai frecvente din sindrom şi apoi a celor mai evidente (de exemplu, în sindromul Waardenburg: distopia cantusului intern *versus* meşă albă frontală);
- se va stabili *gradul de certitudine a diagnosticului* (cert, probabil, posibil, imprecis); acest lucru este important, deoarece diagnosticul va influenţa toate activităţile viitoare: teste, management, sfat genetic.

Cu toate eforturile specialiştilor, într-o proporţie variabilă de cazuri (30-50%), *nu se poate formula un diagnostic specific*. Situaţia este delicată pentru medic şi trebuie explicată clar şi onest pacientului/familiei, oferindu-le două soluţii:

- consultarea altor specialişti cărora să le fie trimise dosarul clinic şi fotografiile pacientului;
- urmărirea şi evaluarea la anumite intervale de timp; simptomatologia unor boli sau sindroame (cu expresivitate variabilă) se poate completa în timp.

Responsabilităţile medicului nu se încheie o dată cu finalizarea unui diagnostic. O acţiune la fel de importantă sau poate mai importantă pentru părinţii unui copil afectat de o boală genetică sau un sindrom malformativ este stabilirea unui **plan de îngrijire** a pacientului (inclusiv de educaţie) bazat pe manifestările bolii ce trebuie influenţate pozitiv, precum şi pe evoluţia ei (istoricul natural) pentru prevenirea unor complicaţii şi stabilirea unor acţiuni în favoarea pacientului. Fiecare sindrom are o listă de complicaţii potenţiale care formează baza unor ghiduri de management preventiv. Astfel de ghiduri „standardizate" sunt disponibile astăzi pentru cele mai frecvente boli şi sindroame (vezi Cassidy şi Allanson, *Management of genetic syndromes*, 1999).

O atenţie specială şi permanentă se va acorda **sprijinului psihologic şi social** al familiei, prin intervenţia unor asistenţi sociali, grupuri de sprijin (asociaţii ale părinţilor copiilor bolnavi).

Ultima acţiune va fi **calcularea riscului de recurenţă** – în funcţie de boală, datele familiale etc. – şi identificarea, pe arborele genealogic, a *persoanelor din familie cu risc genetic crescut*, în vederea unui sfat genetic.

Odată încheiate aceste activităţi, se va ordona şi verifica **dosarul clinic** al pacientului, care va cuprinde: fişa de consult genetic (standard), arborele genealogic, fotografiile pacientului, sinteze ale altor evaluări clinice, buletine de analize de laborator, de radiologie sau anatomopatologice, sinteza cazului (epicriza), date medicale despre alţi membri ai familiei, formele (semnate) de consimţământ pentru teste genetice/solicitări de informaţii medicale etc., copii ale scrisorilor către pacient/familie şi către medicul de familie care trimite cazul. Importanţa medicală, etică şi legală a acestei documentaţii nu mai trebuie discutată, dar vom preciza că ignorarea obligaţiei sau „amânarea" ei din lipsă de timp (mai ales redactarea sintezei de caz/epicrizei şi a scrisorilor cu concluzii şi recomandări către pacientul/familia consultat[ă] şi medicul ce a trimis cazul) poate avea consecinţe negative.

5.8. Comunicarea concluziilor

Această etapă se adresează pacientului/consultandului şi/sau părinţilor săi, precum şi medicului de familie sau celui care a trimis pacientul. În primul caz, întrevederea trebuie atent pregătită, revizuind datele, identificând problemele dificile şi stabilind „un plan" de prezentare care va include: diagnosticul de boală, caracteristicile bolii, istoria ei naturală, posibilităţile de recuperare şi îngrijire, ereditatea şi riscul de recurenţă, opţiunile reproductive ş.a. De multe ori, o singură „şedinţă" este insuficientă şi ineficientă; de aceea, *comunicarea verbală se va însoţi de o comunicare scrisă*, materiale educaţionale şi invitaţia la alte discuţii cu medicul consultant sau cu personalul auxiliar (asistente de genetică, asistenţi sociali, psihologi), cu experienţă în domeniu.

Informaţiile transmise trebuie să fie precise, clare, cuprinzătoare, adaptate nivelului de înţelegere şi percepţie al consultanţilor, precum şi statusului lor cultural (religie, credinţe). Trebuie respectate autonomia, confidenţialitatea şi, în cazul sfatului genetic, caracterul non-direcţional. O problemă delicată este comunicarea unor date altor membri ai familiei care, prin natura genetică a bolii, pot avea un risc crescut de a face sau transmite boala. Consultandul trebuie încurajat să facă el acest lucru sau să fie de acord (în scris) cu abordarea lor de către medicul genetician.

5.9. Urmărirea evoluţiei pacienţilor

Urmărirea efectivă şi eficientă pe termen lung a pacienţilor şi familiei este o acţiune necesară în toate cazurile, dar mai ales atunci când diagnosticul trebuie

confirmat sau stabilit. Sfaturile şi îngrijirile acordate pacienţilor vor fi diferite la vârste diferite; cunoştinţele despre bolile genetice evoluează progresiv şi pot apărea noi teste sau posibilităţi de diagnostic; urmărirea în timp poate facilita profilaxia complicaţiilor posibile.

5.10. Contactarea rudelor cu risc genetic crescut

Pe baza datelor familiale, cu acordul consultanţilor şi sprijinul medicilor de familie, vor fi evaluate rudele apropiate cu risc genetic (dacă acceptă acest lucru) pentru a se stabili dacă sunt sau nu purtători sănătoşi de mutaţie. Acest *diagnostic presimptomatic* este important mai ales pentru bolile (autozomal dominante) care debutează clinic după 30-40 de ani.

*

Indiscutabil, consultul şi sfatul genetic sunt acţiuni complexe, dificil de realizat, ce necesită cunoştinţe, aptitudini şi atitudini, dar şi mult timp. Importanţa lor decisivă pentru cursul vieţii pacientului şi familiei sale este o motivaţie puternică pentru un profesionalism desăvârşit.

B. Explorările genetice

Progresele tehnice realizate în ultimele două decenii au permis apariţia unui număr impresionant de metode de explorare genetică, în special în domeniul geneticii moleculare. Examenul clinic al bolnavului, ce se finalizează cu formularea unei supoziţii diagnostice, este elementul esenţial care va ghida, cel puţin la început, strategia de explorare genetică. Astfel, identificarea unui grup de simptome ce constituie tabloul unui *sindrom monogenic* cunoscut va orienta explorarea genetică către un diagnostic molecular în timp ce identificarea unui *sindrom polimalformativ*, mai mult sau mai puţin caracteristic, va orienta explorările către diagnosticul cromozomial. O situaţie distinctă, pe care o vom prezenta separat, o reprezintă bolile genetice „dobândite", în special cancerul.

Deşi, în majoritatea cazurilor, explorările genetice sunt prescrise de un medic specialist în genetică medicală, acest lucru poate fi făcut şi de alţi specialişti; în această situaţie, medicul practician, ce prescrie analize genetice la anumiţi bolnavi, trebuie să cunoască indicaţiile şi limitele testelor genetice, modul de recoltare, procesare şi trimitere la laborator a probelor utilizate pentru aceste teste, precum şi interpretarea rezultatelor obţinute de către laborator, pentru a le putea comunica adecvat pacienţilor.

1. Diagnosticul cromozomial

Studiul cromozomilor poate fi efectuat prin tehnici de citogenetică convenţională (cariotipul) sau prin tehnici de citogenetică moleculară (FISH, M-FISH, CGH, microreţele de ADN)[6]. Tehnicile de diagnostic citogenetic pot fi divizate în două mari categorii: *tehnici pangenomice*, ce permit evidenţierea unui mare număr de anomalii ce pot interesa toţi cromozomii (cariotipul, tehnica M-FISH sau microreţelele de ADN) şi *tehnici ţintite*, ce pot diagnostica doar una sau câteva tipuri de anomalii cromozomiale interesând un număr limitat de cromozomi (exemplul tipic fiind tehnica de FISH). Trebuie subliniat că metodele de citogenetică moleculară au devenit din ce în ce mai „moleculare" (fiind la limita dintre citogenetică şi genetica moleculară), identificând azi anomalii ce erau puse în evidenţă în urmă cu câţiva ani doar în laboratoarele de genetică moleculară.

Identificarea unui număr tot mai mare de anomalii submicroscopice a determinat apariţia sindromologiei inverse. În **sindromologia clasică**, identificarea mecanismului patogenic debuta cu identificarea unui fenotip comun şi continua cu evidenţierea unei anomalii comune la aceşti pacienţi; în **sindromologia inversă** punctul de plecare îl reprezintă identificarea unei anomalii comune la un grup de pacienţi, urmată de analiza fenotipului şi identificarea acelor semne şi simptome care realizează fenotipul comun, caracteristic anomaliei identificate.

Alegerea strategiei de investigare este dependentă atât de informaţiile clinice, ce pot orienta sau nu spre un diagnostic probabil, cât şi de gama de tehnici realizate într-un anumit laborator.

- Strategia de diagnostic cea mai răspândită (pentru maximizarea raportului cost/beneficiu) este *strategia secvenţială*, de creştere a rezoluţiei analizei la fiecare etapă. Astfel, cel mai frecvent, diagnosticul cromozomial începe cu realizarea cariotipului standard, continuă eventual cu un cariotip

6. În unele cazuri speciale se vor folosi o serie de tehnici situate la frontiera cu genetica moleculară (studiul inactivării cromozomului X, identificarea dizomiilor uniparentale, QF-PCR) care pot furniza informaţii importante în stabilirea diagnosticului.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

realizat printr-o tehnică de înaltă rezoluţie şi se finalizează cu tehnica microreţelelor de ADN.

- În cazul în care fenotipul este evocator pentru un sindrom asociat cu microdeleţii sau microduplicaţii cromozomiale, se realizează în prima etapă analiza ţintită a regiunilor implicate în aceste sindroame, prin tehnicile de citogenetică moleculară (FISH) şi doar ulterior, în cazul în care rezultatul este negativ, se recurge la analiza pangenomică (cariotip şi/sau microreţele de ADN).

Analiza cromozomială reprezintă o metodă valoroasă de diagnostic în multiple situaţii clinice, prenatal sau postnatal. În subcapitolul 2.C au fost prezentate datele relevante privind morfologia şi studiul cromozomilor umani, iar în subcapitolul 7.C s-au discutat anomaliile cromozomiale şi consecinţele lor fenotipice. Aceste noţiuni sunt absolut necesare diagnosticului bolilor cromozomiale (capitolul 11). În această secţiune ne vom referi la ***indicaţiile practice ale examenelor citogenetice*** mai întâi în *bolile constituţionale* şi apoi în *bolile dobândite* prin mutaţii somatice.

1.1. Indicaţiile testului cromatinei sexuale

Cromatina sexuală X sau Y (vezi subcapitolul 2.C.2) ne oferă informaţii privind *numărul cromozomilor sexuali* şi, prin aceasta, date preţioase pentru stabilirea sexului genetic (XX sau XY) precum şi a anomaliilor numerice (aneuploidiilor) gonozomiale. Testul cromatinei sexuale este *un test de* screening *simplu, ieftin, rapid şi util în practică*, în situaţii clinice bine definite. Deşi un test anormal reprezintă o opţiune foarte serioasă pentru diagnostic, mai ales într-un context clinic sugestiv, trebuie precizat că diagnosticul final va fi pus numai prin analiza cromozomială. De aceea, testul cromatinei sexuale este tot mai puţin utilizat, de cele mai multe ori analiza cromozomilor prin tehnicile de citogenetică convenţională sau moleculară (FISH cu sonde specifice cromozomilor X şi Y) fiind indicată de la început.

Testul cromatinei X se recomandă în două situaţii:

- o anomalie a organelor genitale externe (hipospadias peno-scrotal ± testiculi necoborâţi congenital, micropenis etc.) sau o stare intersexuală evidentă; cromatina sexuală va permite stabilirea sexului genetic (şi declararea sexului civil în concordanţă cu sexul genetic) şi încadrarea diagnostică a cazului;
- semne clinice care ar putea evoca fenotipul unor anomalii ale cromozomilor sexuali (în special 45,X sau 47,XXY) sau ale unor disgenezii gonadice:
  - *la fete*: hipostatură proporţionată, gât scurt ± palmat, limfedem pe faţa dorsală a picioarelor sau/şi mâinilor; pubertate întârziată, caractere sexuale secundare reduse, amenoree primară sau secundară precoce;
  - *la băieţi*: talie înaltă, pe seama membrelor inferioare; caractere sexuale secundare reduse; ginecomastie, testiculi mici.

Principala limită a testului cromatinei sexuale este caracterul echivoc al rezultatului obţinut; spre exemplu, un test Barr negativ la o persoană de sex feminin poate semnala fie un sindrom Turner (45,X), fie un sindrom Morris (46,XY), fie o disgenezie gonadică mixtă (46,XY/45,X), în această situaţie efectuarea cariotipului fiind absolut necesară pentru a stabili un diagnostic citogenetic cert.

Probleme de interpretare apar şi în cazul rezultatelor cert pozitive pentru cromatina X, dar cu un procent mic de celule pozitive (sub 10-12%) (situaţie ce ar putea corespunde unui mozaicism), sau, mai rar, în cazul unui corpuscul Barr de dimensiuni anormale (mai mic sau mai mare de 1,5 microni) care poate reflecta o anomalie de structură a cromozomului X: o deleţie parţială a cromozomului X sau un izocromozom X de braţ lung.

În toate situaţiile unui test anormal al cromatinei sexuale este necesar un cariotip. De aceea, considerăm că testul cromatinei sexuale este doar un test util de *screening*, în situaţiile clinice menţionate mai sus.

1.2. Indicaţiile tehnicilor de citogenetică convenţională

Pentru diagnosticul anomaliilor constituţionale studiul cromozomilor prin tehnicile de citogenetică convenţională (cariotip) poate fi efectuat postnatal şi prenatal (vezi capitolul 2.C). Aceste tehnici sunt complexe şi scumpe, dar relaţia cost-beneficiu este excelentă, deoarece se pune un diagnostic precis, pentru o viaţă (de regulă nu este nevoie repetarea analizei).

> Rezoluţia metodelor de analiză cromozomială este un element important de care trebuie ţinut seama căci aceasta determină proporţia anomaliilor detectate. Astfel, cariotipul cu o rezoluţie de 400 de benzi/genom haploid este suficient pentru diagnosticul aneuploidiilor (trisomiile 13, 18, 21) sau pentru explorarea avorturilor precoce; caracterizarea anomaliilor cromozomiale echilibrate sau explorarea pacienţilor cu debilitate mintală necesită însă o rezoluţie de 550 benzi/genom haploid. Analiza printr-o tehnică de înaltă rezoluţie este considerată ca o tehnică ţintită, permiţând studierea detaliată a unei regiuni cromozomiale pentru care există suspiciuni la analiza cu o rezoluţie de 550 benzi (aceasta deoarece analiza tuturor cromozomilor la o rezoluţie de 850 benzi este extrem de dificilă datorită suprapunerii cromozomilor prometafazici).

Medicii practicieni trebuie să cunoască *indicaţiile metodelor de analiză cromozomială – postnatal*, la

copii şi adulţi, sau *prenatal* pentru o selecţie corectă a cazurilor ce trebuiesc dirijate către specialiştii şi laboratoarele de citogenetică medicală.

a) Studiul postnatal al cromozomilor la copii

- La copiii cu *anomalii congenitale multiple* (minore ± majore) însoţite sau nu de tulburări de creştere prenatală şi/sau întârziere în dezvoltarea psihomotorie postnatală. Efectuarea cariotipului este obligatorie chiar şi în situaţiile în care aspectul clinic este caracteristic pentru un diagnostic de boală cromozomială (în special sindrom Down), pentru a stabili exact genotipul pacientului.
- La copiii cu *hipotonie neonatală* şi/sau *dismorfie*.
- La copiii cu *ambiguitate sexuală*.
- În *debilităţile mentale* (indiferent de grad) de cauze nedeterminate (excluzându-se deci cazurile de suferinţă fetală, meningo-encefalite postnatale, boli metabolice) şi/sau *tulburări de comportament* – mai ales dacă se însoţesc de dismorfie facială şi/sau anamneză familială pozitivă. La aceşti pacienţi se va face cariotipul cu marcaj standard cu marcaj precum şi teste pentru evidenţierea cromozomului X fragil[7].
- În *tulburările de creştere* şi în *tulburările de dezvoltare pubertară* sau în prezenţa unor semne de disgenezie gonadică.

b) Studiul postnatal al cromozomilor la adulţi

- La cuplurile cu *tulburări de reproducere* (≥2 avorturi spontane şi/sau nou-născuţi morţi/vii plurimalformaţi) pentru a se evidenţia o posibilă anomalie cromozomială echilibrată la unul dintre parteneri (5-10% din cazuri).
- La persoanele cu *stări intersexuale*, pentru stabilirea sexului genetic (XX sau XY) sau evidenţierea unor anomalii de structură ale cromozomilor sexuali.
- La bărbaţii cu o *spermogramă anormală* (azoo- sau oligospermie, teratospermie) şi la femeile cu *amenoree primară* (absenţa menarhei) sau *amenoree secundară precoce*.
- În cadrul bilanţului biologic pentru persoanele ce recurg la tehnicile de *procreare asistată medical*.
- Părinţi sau rude directe ale unor persoane purtătoare de anomalii cromozomiale de structură echilibrate sau dezechilibrate (realizând ceea ce se numeşte *studiul familial*). În cazul în care o anomalie cromozomială este identificată, investigaţiile sunt extinse, în mod secvenţial şi pe baza studiului arborelui genealogic, la rudele care ar putea moşteni acea anomalie.

c) Studiul prenatal al cromozomilor

Diagnosticul cromozomial prenatal, folosind celule fetale recoltate, sub control ecografic, din placentă (vilozităţi coriale, la 10-11 săptămâni de sarcină), lichid amniotic (15-16 săptămâni de sarcină) sau sânge fetal (obţinut prin cordocenteză la 17-18 săptămâni de sarcină) este indicat în situaţiile următoare:

- la *femeile de peste 35-38 de ani*;
- atunci când se identifică la gravidă *semne ecografice de alarmă* (vezi capitolul 19) sau *testele pozitive de* screening *biochimic prenatal,* efectuate în primul sau al doilea trimestru de sarcină pentru aneuploidiile fetale (vezi capitolul 11);
- unul din *părinţi are o anomalie cromozomială echilibrată*;
- cuplul a avut un *copil cu o anomalie cromozomială de novo* (deci cariotipul părinţilor este normal) şi uneori poate avea un risc crescut pentru un alt copil cu anomalie cromozomială (de exemplu, mozaicism gonadal parental);
- pentru stabilirea *sexului genetic, în cazul bolilor monogenice recesive gonozomale* (în care se îmbolnăvesc numai ½ din băieţi), atunci când nu există o metodă de diagnostic prenatal specific pentru afecţiunea respectivă;

1.3. Indicaţiile tehnicilor de citogenetică moleculară

În cazul în care *examenul clinic al unui pacient* orientează diagnosticul spre un *sindrom cu microdeleţie sau microduplicaţie*, explorarea genetică este dirijată către utilizarea în primă intenţie a tehnicilor ţintite de citogenetică moleculară (FISH, MLPA, QF-PCR) folosind sonde specifice uneia sau mai multor regiuni cromozomiale. Dacă rezultatul analizei este negativ, se va trece ulterior la realizarea cariotipului cu tehnici de înaltă rezoluţie şi/sau a analizei pangenomice utilizând microreţelele de ADN.

Metodele pangenomice de citogenetică moleculară (M-FISH, CGH) au o utilizare mai limitată în citogenetica constituţională. Ele sunt frecvent folosite pentru a identifica originea cromozomilor marker supranumerari, a cromozomilor în inel de mărime mică şi a fragmentelor cromozomiale de mici dimensiuni ataşate altor cromozomi.

7. Aceste teste erau indicate doar la băieţi cu retard mental. Recent s-a stabilit însă că proporţia fetelor heterozigote pentru mutaţia completă X-fra ce manifestă simptome (mai puţin grave decât la băieţi) este importantă şi de aceea testele se realizează şi la fete.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.4. Indicaţiile analizei cromozomiale cu microreţele de ADN (cariotipul molecular)

Cariotipul molecular realizat cu ajutorul microreţelelelor de ADN permite identificarea dezechilibrelor genomice de talie mică (sub limita de rezoluţie a cariotipului), dependentă de numărul de sonde ce constituie microreţeaua. Marele dezavantaj al acestor tehnici este însă imposibilitatea detectării anomaliilor cromozomiale echilibrate (cum sunt translocaţiile reciproce, inversiile, inserţiile).

Astfel, principalele indicaţii ale analizei cu microreţele de ADN sunt:

- *retardul mental* de cauze nedeterminate indiferent de grad, asociate sau nu cu dismorfie;
- *tulburările de comportament*/anumite boli psihice (schizofrenie, boala maniaco-depresivă);
- tulburările încadrate în spectrul autismului;
- identificarea conţinutului eucromatinic al *cromozomilor marker supranumerari* (bisatelizaţi sau mici cromozomi în inel) identificaţi în cazul diagnosticului prenatal cromozomial;
- *caracterizarea precisă a dezechilibrelor genomice* identificate prin tehnicile de citogenetică convenţională.

Unele dintre aceste indicaţii, în special tulburările neuro-psihiatrice, impun (pentru centrele care dispun de posibilitatea analizei prin microreţele de ADN), efectuarea în prima etapă a analizei pangenomice şi doar într-o a doua etapă, dacă este necesar, un cariotip pentru a identifica eventualele anomalii cromozomiale echilibrate, imposibil de diagnosticat cu ajutorul microreţelelor de ADN.

Identificarea unei anomalii cromozomiale dezechilibrate folosind microreţelele de ADN este doar punctul de debut al investigaţiilor deoarece această anomalie trebuie confirmată printr-o altă metodă de analiză (FISH, MLPA, Q-PCR), iar mecanismul său de apariţie (*de novo* sau moştenită) trebuie elucidat pentru a putea oferi o consiliere genetică optimă.

Trebuie remarcat că în multe cazuri sunt identificate anomalii *de novo* de mică talie, anomalii nedescrise încă în literatura de specialitate şi pentru care informaţiile privind funcţiile genelor afectate sunt minime sau absente. În aceste cazuri anomalia este catalogată ca *„anomalie cu efect necunoscut"*, iar reevaluarea periodică a patogenicităţii anomaliei, în funcţie de noile informaţii ştiinţifice, este absolut necesară. Consilierea genetică în aceste situaţii este deosebit de dificilă.

1.5. Indicaţiile analizei cromozomiale în bolile dobândite prin mutaţii somatice

Analiza cromozomială în bolile somatice dobândite prin mutaţii somatice este indicată în trei situaţii:

- hemopatiile maligne şi, mai rar, în tumorile solide, pentru diagnostic pozitiv şi diferenţial, prognostic sau urmărirea evoluţiei tratamentului;
- în cazurile rare de sindroame cu instabilitate cromozomială (sindromul Bloom, anemia Fanconi, sindromul Nijmegen, sindromul ICF, sindromul Roberts, Ataxia-telangiectazia) asociate cu un risc crescut de transformare malignă.
- pentru depistarea efectului mutagen al expunerii profesionale, accidentale sau ca rezultat al unor tratamente medicale care comportă expunerea la radiaţii ionizante sau administrarea de substanţe chimice clastogene.

Ne vom referi, în principal, la studiul cromozomilor celulelor tumorale ce poate fi realizat în cadrul bilanţului iniţial al bolii sau, în cazul hemopatiilor, în diferite momente în decursul evoluţiei bolii: în timpul tratamentului pentru a aprecia eficacitatea acestuia sau în timpul remisiunilor pentru a detecta eventualele recăderi (vezi capitolul 18).

Studiul citogenetic al celulelor tumorale este adesea dificil ca urmare a dificultăţilor în a obţine o calitate corespunzătoare a mitozelor şi complexităţii cariotipului. Eşantioanele biologice analizate sunt măduva osoasă şi sângele periferic (dacă conţine un număr suficient de blaşti) în hemopatiile maligne, fragmente de ganglion limfatic şi măduva hematogenă (dacă este invadată) în limfoame, fragmente tumorale obţinute prin exereză chirurgicală în tumorile solide şi, în toate cazurile, epanşamentele pleurale, lichidul de ascită şi, eventual, lichidul cefalorahidian. Condiţiile de cultură sunt specifice fiecărui tip de specimen şi tipului celular ce trebuie analizat.

a) Tehnici de citogenetică convenţională

Studiul cromozomilor prin tehnicile de citogenetică convenţională este util pentru identificarea anomaliilor de număr şi, în special, a anomaliilor de structură specifice. Cariotipul permite atât identificarea anomaliilor clonale specifice implicate în transformarea malignă, precum translocaţia t(9;22)(q34;q11) cu fuziunea genelor *BCR* şi *ABL* în leucemia mieloidă cronică sau translocaţia t(15;17)(q22;q21) cu fuziunea *PML-RARA* în leucemia mieloidă acută de tip LAM3, cât şi a anomaliilor câştigate în decursul evoluţiei, anomalii ce pot indica fie un prognostic bun – t(12;21)(p13;q22) în leucemiile acute limfoide –, fie un prognostic defavorabil – pierderea cromozomului 7, deleţia braţului scurt al cromozomului 17 cu gena *TP53*.

BCU "IULIU HAŢIEGANU" LIBRARY

b) Tehnici de citogenetică moleculară

Tehnicile de citogenetică moleculară, de tip FISH cu sonde specifice, permit identificarea țintită și rapidă în interfază a multor anomalii echilibrate (translocații reciproce sau inversii) sau dezechilibrate (-7, +8, -17p, +21) permițând, în combinație cu tehnicile de citogenetică convențională, o caracterizare cât mai completă a anomaliilor cromozomiale și identificarea eventualelor clone ce scapă prin studiul mitozelor. Tehnicile de tip M-FISH sau CGH sunt mult mai utilizate decât cele de citogenetică convențională deoarece permit o mai bună caracterizare a cariotipurilor complexe, în special în cazul tumorilor solide.

Tehnicile de citogenetică moleculară interfazică sunt tehnicile cele mai folosite în evaluarea răspunsului la tratament, în detectarea recăderilor și în evaluarea himerismului după transplantul de măduvă. Utilizarea tehnicilor de analiză cu microrețele de ADN polimorfice sau non-polimorfice este tot mai răspândită permițând o caracterizare fină a dezechilibrelor genomice (deleții homozigote sau heterozigote, amplificări) sau a regiunilor cu pierderea heterozigoției (vezi capitolul 18).

Trebuie însă să subliniem că un element esențial în diagnosticul hemopatiilor maligne și al cancerelor solide este reprezentat în prezent de diagnosticul molecular. Astfel, încadrarea nosologică a multor tipuri tumorale și tratamentul asociat sunt dependente atât de mutațiile identificate în oncogene sau în genele supresoare de tumori prin studiul ADN-ului celulelor tumorale, cât și de profilul de expresie identificat în aceste celule prin studiul ARN cu ajutorul microrețelelor de expresie.

2. Diagnosticul molecular

2.1. Definiție. Obiective

Orice boală este definită ca entitate morbidă pe baza mai multor elemente: cauza (*etiologie*), mecanismul de producere (*patogenie*) – care determină manifestările clinice – tabloul clinic și paraclinic (fenotipul) specific. Cu cât aceste elemente sunt mai bine definite, cu atât diagnosticul este mai precis, iar strategiile terapeutice și preventive sunt mai clar direcționate.

În medicina clasică, procesul diagnostic este bazat pe identificarea unui tablou clinic și pe analiza *in vitro* a celulelor sau țesuturilor modificate, a căilor biochimice alterate sau a unor agenți infecțioși cauzali. Cu toate că această *analiză fenotipică* a fost constant îmbunătățită în decursul timpului prin aplicarea unor tehnici și metode noi (ca microscopia, spectrometria, enzimologia sau imunohistochimia ș.a.), multe boli nu au putut fi complet definite din punct de vedere etiopatogenic până la dezvoltarea metodelor de analiză genotipică, a ADN sau ARN.

Conceptul de **diagnostic molecular** se referă la noile tehnologii de diagnostic care au drept obiect (țintă) de studiu ADN și ARN celular, urmărind identificarea mutațiilor și polimorfismelor genice implicate în producerea bolilor, identificarea unor genomuri exogene patogene (în bolile infecțioase) precum și identificarea precisă a persoanelor („amprenta genetică" – *DNA fingerprinting*). În capitolul 5.B. au fost prezentate principiile metodelor de detecție și analiză a acizilor nucleici – bazate pe hibridizarea moleculară, PCR și secvențiere – subliniind progresele remarcabile realizate în ultimii 10 ani.

- **Hibridizarea moleculară** a acizilor nucleici a evoluat de la metodele clasice de hibridizare cu țintă imobilizată pe un suport solid (Southern blot, Northern blot, ASO) la hibridizarea acizilor nucleici pe microrețele (hibridizarea inversă) alcătuite din câteva mii de *sonde oligonucleotidice diferite* (fiecare fiind specifică pentru o anumită secvență ADN). Tehnologia performantă a microrețelelor ADN, care realizează mii de teste în paralel, a accelerat multe tipuri de investigații, folosindu-se în special pentru: *analiza simultană a expresiei unui număr foarte mare de gene* („*profilul de expresie*" în diferite stări patologice) și *genotipare* pentru determinarea variabilității ADN (inclusiv în medicina legală) și diagnosticul mutațiilor în gene cunoscute.
- **Metoda clasică a PCR** a condus în timp la dezvoltarea unei game largi de variante care au fost dezvoltate pentru aplicații specifice, permițând analiza într-o singură reacție a mutațiilor cele mai frecvente care determină o anumită boală genetică (prin combinarea PCR cu specificitate alelică și PCR multiplex) sau în cazul Q-PCR cuantificarea expresiei genelor, detectarea mutațiilor sau a polimorfismelor mononucleotidice (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs) și măsurarea abundenței unor secvențe ADN sau ARN în produse clinice (de exemplu, în monitorizarea evoluției infecției cu virusul HIV sau cu virusul hepatitei B).
- **Metodele de secvențiere a ADN** au evoluat de la tehnica clasică de sinteză enzimatică a lui Sanger la tehnici de secvențiere automată *bazate pe culoare* (fluorocromi), mult mai simple și mai ales mai rapide, și ulterior la *pirosecvențiere* (o tehnologie de secvențiere a ADN complet diferită de metoda Sanger) și *secvențierea masivă paralelă* a unui număr enorm de fragmente diferite de ADN (tehnicile de sevențiere de generația a doua și a treia). Toate acestea au transformat radical genetica moleculară, aducând-o în zilele noastre la performanțe altădată de neimaginat.

În această secțiune vor fi prezentate doar obiectivele și *strategia diagnosticului molecular*. O prezentare completă și actualizată permanent a metodelor de diagnostic molecular în diferite boli genetice se poate găsi pe site-ul GeneTests – GeneClinics (http://www.geneclinics.org.)

BIBLIOTECA CENTRALĂ UMF TIMIȘOARA

Obiectivele diagnosticului molecular al bolilor genetice sunt:

- diagnosticul genotipic postnatal sau prenatal al bolnavilor cu afecțiuni monogenice;
- diagnosticul presimptomatic al purtătorilor de alele mutante pentru boli cu transmitere dominantă şi cu manifestare tardivă;
- identificarea purtătorilor sănătoşi (heterozigoți) de alele mutante pentru boli cu transmitere recesivă;
- identificarea persoanelor purtătoare de premutații (pentru afecțiunile determinate de mutații dinamice);
- identificarea unor mutații genice sau rearanjări cromozomiale în vederea stabilirii stadiului sau a evaluării prognosticului unor tumori sau hemopatii maligne.

În funcție de nivelul cunoştințelor referitoare la substratul genetic al afecțiunii şi la numărul şi frecvența populațională a mutațiilor, se disting două categorii de *metode de diagnostic molecular*: metode directe şi metode indirecte.

- **Metodele directe** – aplicabile atunci când gena şi/sau mutația sunt cunoscute – urmăresc evidențierea unei mutații la nivelul genotipului unui individ. Specimenele (ADN, ARN) provenite de la consultand sunt testate pentru identificarea unui anumit tip de mutație; testul este individual şi furnizează informații doar despre respectivul individ.
- **Metodele indirecte** – aplicabile atunci când gena nu a fost secvențiată sau este greu accesibilă diagnosticului direct – urmăresc transmiterea intrafamilială a unor *markeri genetici* înlănțuiți cu locusul morbid, pentru a descoperi dacă consultandul a „moştenit" sau nu alela mutantă de la un părinte heterozigot; testul vizează o familie şi furnizează informații referitoare la segregarea unui anumit segment cromozomial în această familie.

2.2. *Metode directe de diagnostic molecular*

Metodele directe sunt metodele ce analizează direct ADN sau ARN în scopul evidențierii unei mutații la individul sănătos (heterozigot) sau bolnav, atunci când gena şi/sau mutația sunt cunoscute. Testul este individual şi furnizează informații doar despre respectivul individ. Există astăzi o multitudine de metode de analiză directă, fiecare cu indicații şi limite precise, ce pot fi separate în:

- ***secvențierea genei***, metoda generală cea mai performantă de identificare a tuturor mutațiilor prezente în fragmentul de ADN analizat; mărimea genelor umane (sute de mii sau milioane de pb) şi existența heterogenității genetice fac ca această metodă să nu poată fi utilizată în toate cazurile.
- ***metode țintite*** (tabelul 10.4), pentru care sunt necesare cunoştințe prealabile despre mutațiile deja identificate în gena respectivă; se folosesc sonde specifice unei singure mutații astfel încât aceste tehnici permit identificarea numai a mutațiilor identificate anterior la alți bolnavi.
- ***metode de* screening** (tabelul 10.5) permit identificarea la pacient a unui fragment de ADN cu proprietăți fizico-chimice diferite de cele ale aceluiaşi fragment de ADN cu secvență normală, schimbarea fiind datorată prezenței de mutații; deoarece aceste metode nu pot preciza nici tipul nici poziția mutației în secvența ADN, caracterizarea mutației trebuie realizată ulterior prin secvențierea fragmentului de ADN cu un „comportament anormal" la unul din aceste teste. Diminuarea importantă a costului secvențierii a redus însă mult impactul metodelor de *screening*.

Tabelul 10.4. Metode țintite de diagnostic molecular

Metoda	Comentarii
Hibridizarea ADN-ului amplificat cu oligonucleotide specifice de alelă (ASO) pe dot-blot sau microrețele de ADN	Metodă generală pentru mutații punctiforme determinate; utilizarea unor seturi largi de oligonucleotide permite scanarea concomitentă pentru multiple mutații.
Testul de ligare a oligonucleotidelor (OLA)	Metodă generală pentru mutații punctiforme determinate
PCR utilizând primeri cu specificitate de alelă (test ARMS)	Metodă generală pentru mutații punctiforme; designul amorselor este critic. Poate fi adaptat pentru tehnologia microrețelelor.
PCR cu primeri situați de o parte şi de alta a unui punct de translocație, deleție sau inserție	Amplificarea reuşită indică prezența rearanjarii cromozomiale căutate.
Analiza RFLP (digestie enzimatică a ADN-ului amplificat prin PCR şi evaluarea mărimii fragmentelor prin electroforeză în gel şi Southern blot)	Numai pentru deleții sau inserții de dimensiuni mari sau mutații punctiforme în care mutația creează sau abolește un situs de restricție natural sau unul introdus prin utilizarea unor primeri PCR speciali (PCR-based Southern).

Tabelul 10.5. Metode de *screening* în diagnosticul molecular

Metoda	Avantaje	Dezavantaje
Mobilitatea electroforetică în gel a heteroduplexurilor	Metodă foarte simplă şi ieftină	Numai pentru secvenţe sub 200pb. Sensibilitate limitată. Nu relevă poziţia modificărilor.
Cromatografie de înaltă rezoluţie în soluţie denaturantă	Metodă rapidă, cantitativă	Echipament costisitor. Nu relevă poziţia modificărilor nucleotidice.
Polimorfismul conformaţiei ADN monocatenar (SSCP)	Metodă simplă, echipament ieftin	Numai pentru secvenţe sub 200pb. Sensibilitate limitată. Nu relevă poziţia anomaliilor.
Electroforeză în gel cu gradient denaturant (DGGE)	Metodă sensibilă	Alegerea amorselor este critică. Amorsele sunt costisitoare. Nu relevă poziţia anomaliei.
Clivarea perechilor de baze anormale: (mismatch cleavage) chimic, enzimatic	Metodă sensibilă Identifică poziţia modificării nucleotidice.	Reactivi toxici. Metodă dificilă. Rezultate de calitate slabă.
Testul proteinelor trunchiate (PTT)	Mare sensibilitate pentru mutaţiile cu terminare prematură a translaţiei Identifică poziţia mutaţiei.	Numai pentru mutaţii cu încheiere prematură a lanţului. Metodă costisitoare, dificilă. Necesită ARN.
Dideoxy *fingerprinting*	Mare sensibilitate	Dificil de interpretat
„Cipuri" ADN de hibridizare de minisecvenţializare	Metode rapide, eficiente Pot detecta şi defini toate modificările nucleotidice.	Echipament costisitor. Gamă limitată de gene. Tehnologie nouă, încă în dezvoltare.

La fel ca şi în cazul analizei cromozomilor, metodele de diagnostic molecular trebuiesc folosite într-o ordine logică în scopul de a maximiza raportul cost/beneficiu. Astfel, metodele de analiză moleculară directă sunt folosite diferenţiat, în funcţie de informaţiile obţinute în cursul consultaţiei de genetică medicală. Două situaţii pot fi astfel individualizate:

(1). *Mutaţia este cunoscută* în familia consultandului, care poate fi bolnav sau nu. În acest caz testarea se realizează fie ţintit, căutându-se prin metode de diagnostic molecular de tipul ASO sau OLA numai mutaţiile deja identificate în familia respectivă, fie prin secvenţiere.

(2). *Mutaţia nu este cunoscută* în familia consultandului, fenotipul fiind însă evocator pentru o boală monogenică ale cărei cauze sunt identificate. În acest caz strategia de diagnostic este realizată în mai multe etape, trecerea la o etapă ulterioară realizându-se doar dacă nu s-au identificat mutaţii patogenice:

a. Testarea pentru alelele cele mai frecvente în populaţia de origine a consultantului. Metodele folosite pot fi de tipul ASO şi OLA sau secvenţierea regiunilor genice în care au fost identificate majoritatea mutaţiilor (regiuni mutaţionale „calde"). Dacă boala este heterogenă din punct de vedere genetic datorită prezenţei de mutaţii în mai multe gene, căutarea mutaţiilor în celelalte gene poate fi realizată în paralel dacă frecvenţele alelelor mutante sunt importante.
b. Secvenţierea întregii gene, inclusiv a regiunilor netranscrise 5' şi 3' şi a unor porţiuni din introni.
c. Secvenţierea altor gene în cazul bolilor cu heterogenitate genetică.
d. Analiza ARNm în scopul identificării fie a anomaliilor de matisare (ce pot fi produse de mutaţii în regiuni netranscrise, care de obicei nu sunt secvenţiate) folosind tehnica RT-PCR şi secvenţierea produşilor PCR amplificaţi, fie a anomaliilor cantitative ale ARNm (determinate de degradarea ARNm datorită prezenţei de mutaţii destabilizatoare) prin tehnica de Q-RT-PCR.
e. Imposibilitatea identificării unei mutaţii patogenice cu metodele descrise anterior impune utilizarea, în ultimă instanţă, a analizei de înlănţuire, metodă indirectă ce necesită studierea unui număr cât mai mare de membri ai familiei, atât bolnavi, cât şi sănătoşi, în scopul identificării unui haplotip al genei sau al regiunii în care este situată gena şi care este asociat cu fenotipul anormal. Această metodă se poate realiza doar dacă familia este suficient de mare, dacă mai există persoane bolnave în familie şi dacă markerii folosiţi sunt informativi la indivizii studiaţi.

În schema de analiză prezentată mai sus, deşi etapele b-d au fost exemplificate doar cu tehnici ţintite de analiză moleculară, tehnicile de *screening* pot fi, de asemenea, folosite. În acest caz sensibilitatea de detecţie a mutaţiilor poate fi variabilă, dependentă

de sensibilitatea tehnicii, unele mutaţii scăpând astfel identificării. Metodele de *screening* permit doar identificarea unui fragment de ADN sau ARN cu un „comportament anormal" care va fi secvenţiat ulterior. De aceea, în cazul genelor cu un număr redus de exoni sau în care mutaţiile sunt localizate numai în anumite regiuni, pentru a accelera procesul de identificare a mutaţiilor se foloseşte direct secvenţierea.

Simpla identificare a unei variaţii de secvenţă la un bolnav nu este suficientă, patogenicitatea acesteia trebuind demonstrată. Identificarea caracterului patogen poate fi stabilită pe mai multe căi.

(1) *Variaţia de secvenţă este deja cunoscută* şi repertoriată în bazele de date fie ca un polimorfism identificat în populaţie (SNP), deci fără efect patogen, fie ca mutaţie patogenă, patogenicitatea fiind susţinută în acest caz de frecvenţa cu care a fost identificată la bolnavi şi prin caracterizarea efectului funcţional la nivelul ARN, al proteinei, al celulei sau al organismului.

(2) *Variaţia de secvenţă nu a mai fost descrisă*, în acest caz efectul patogen trebuind a fi demonstrat. În general pot fi deosebite trei situaţii.

a) Efectul patogen este evident, mutaţia fiind fie o anomalie a matisării ce produce apariţia unui codon stop precoce, fie o mutaţie punctiformă de tip stop, ambele determinând sinteza unei proteine trunchiate, nefuncţionale;

b) Efectul patogen este mai puţin evident, mutaţiile determinând fie modificarea unui aminoacid, fie schimbarea unei baze într-o regiune necodantă. În acest caz efectul patogen poate fi demonstrat, cu un grad de confidenţă mai mare sau mai mic, prin trei tipuri de analize;

- **Analiza *in silico*** a secvenţei mutante, folosind metode ale bioinformaticii, ce permit determinarea efectului probabil pe care variaţia identificată îl poate avea asupra ARN mesager sau a proteinei. Astfel, analiza filogenetică poate determina dacă variaţia afectează un aminocid conservat în cursul evoluţiei speciilor sau un aminoacid conservat într-un anumit domeniu funcţional al proteinei, probabilitatea ca mutaţia să fie patogenă în aceste două situaţii fiind foarte crescută. Analiza filogenetică poate identifica, de asemenea, modificări ale unor nucleotide din regiuni necodante puternic conservate de-a lungul evoluţiei, regiuni care ar putea avea un rol reglator. Programele de analiză şi simulare a structurii tridimensionale a proteinelor pot evidenţia modificări ale aminoacizilor din regiuni importante funcţional: situs catalitic sau regiuni de interacţiune proteină-proteină. Deoarece acest tip de analiză nu necesită decât un calculator cu conexiune Internet şi cunoştinţe în bioinformatică, este uşor de realizat într-un laborator de diagnostic.
- **Analiza *in vitro*** permite identificarea efectului mutaţiei asupra ARN sau proteinei. Astfel, tehnici precum RT-PCR şi Q-RT-PCR pot identifica fie anomalii ale matisării, fie diminuarea cantităţii de ARNm, în timp ce tehnicile Western-blot, imunoprecipitarea sau metoda hibrizilor între două drojdii pot identifica diminuarea cantităţii de proteină sau alterarea proprietăţilor proteinei (a interacţiunilor proteină-proteină). Realizarea tehnicilor de confirmare a patogenicităţii la nivel de ARN poate fi imposibilă atunci când gena mutantă este exprimată doar în câteva ţesuturi, pentru care biopsia la pacient este imposibilă. Unele dintre aceste tehnici pot fi realizate într-un laborator de diagnostic, altele sunt însă de domeniul laboratoarelor de cercetare.
- **Analiza *in vivo*** urmăreşte identificarea efectului funcţional al mutaţiei la nivelul organismului. Aceste analize folosesc tehnici de manipulare genetică (tehnica ARN interferent sau animale transgenice) efectuate pe organisme model şi sunt realizate doar în laboratoare de cercetare cu o dotare corespunzătoare.

c) *Variaţia este foarte probabil nepatogenă* fiind o variantă rară, specifică individului sau familiei sale.

Rezultatul scris al analizei moleculare transmis clinicianului trebuie să conţină informaţii privind tehnica de realizare a analizei, variaţiile identificate, patogenicitatea lor şi modul de validare a patogenicităţii (referinţe bibliografice, analiză bioinformatică etc.).

2.3. *Metode indirecte de diagnostic molecular*

Metodele indirecte sunt aplicabile atunci când gena nu este accesibilă diagnosticului direct şi urmăresc transmiterea intrafamilială a unor markeri genetici polimorfici înlănţuiţi cu locusul morbid. Analiza mai multor membri ai familiei permite definirea haplotipul asociat alelei mutante, dominante sau recesive. Analiza ADN probandului permite identificarea haplotipurilor acestuia pentru regiunea de interes şi determinarea prezenţei sau absenţei alelei mutante. Testul vizează o familie şi furnizează informaţii referitoare la segregarea unui anumit segment cromozomial în această familie. Realizarea acestui tip de analiză este de domeniul laboratoarelor de diagnostic.

2.4. *Metode ce asociază microreţele de ADN şi secvenţierea*

În situaţia în care gena responsabilă de manifestările patogene este necunoscută identificarea ei poate fi

realizată doar prin analiza segregării markerilor distribuiți în întregul genom. Utilizarea markerilor polimorfici de tip *microsateliți*, larg răspândită în trecut, este în declin, lăsând locul noilor metode de genotipare ce folosesc *microrețelele de ADN de tip SNP* (Illumina, Affymetrics sau Agilent). Informativitatea redusă a markerilor de tip SNP datorită bilalelismului, dezavantajul major al markerilor de tip SNP, este depășită de numărul extrem de mare de markeri folosiți (până la 1-2 milioane), răspândiți în tot genomul. Identificarea regiunilor candidat cu această tehnică pangenomică este cuplată cu secvențierea prin tehnicile de generațiile a doua și a treia, numite și *tehnici de secvențiere masivă paralelă*, fie a întregului genom al bolnavilor în totalitatea sa, fie doar a regiunilor de interes, după o prealabilă etapă prealabilă de îmbogățire folosind un tip special de microrețele ADN. Numărul de variații de secvență obținute prin această strategie este mare, fiind deci necesare metode de validare a patogenicității.

C. Sfatul genetic

1. Definiție. Obiective. Circumstanțe de acordare

Sfatul genetic a fost definit ca fiind un *proces de comunicare* ce se ocupă cu problemele umane și psihologice asociate cu prezența unei boli genetice sau cu riscul ei de apariție într-o familie[8]. În esență, „pacienții și/sau rudele lor cu risc pentru o boală ce poate fi ereditară sunt sfătuiți asupra consecințelor bolii, probabilității apariției sau transmiterii ei în familie și căilor prin care aceasta poate fi prevenită sau ameliorată" (Harper, 1998).

Acest proces, efectuat de una sau mai multe persoane specializate (genetician, psiholog-consilier, asistent social), implică o încercare de a ajuta individul sau familia:

- să înțeleagă faptele medicale, inclusiv diagnosticul, evoluția probabilă a bolii și posibilitățile de îngrijire;
- să aprecieze modul în care factorii genetici contribuie la producerea bolii, modul ei de transmitere și riscul de recurență la anumite rude;
- să înțeleagă opțiunile și alternativele reproductive determinate de riscul de recurență;
- să aleagă acțiunile care li se par corespunzătoare în raport cu riscul lor și scopurile familiei din care fac parte și să acționeze în concordanță cu această decizie informată;
- să facă cea mai bună corecție posibilă a bolii la o persoană afectată din familie și/sau a riscului de recurență a acelei boli.

Aceste obiective demonstrează evident că sfatul genetic este un *act medical specializat și complex*. El reprezintă de fapt *acțiunea finală a consultului genetic*, prin care medicul a stabilit diagnosticul și prognosticul bolii probandului, posibilitățile de îngrijire și recuperare, tipul de boală genetică și riscul de recurență pentru consultand. Toate aceste date vor fi comunicate adecvat celor care le-au solicitat, pentru a lua decizii informate.

Sfatul genetic poate fi solicitat (vezi și secțiunea A.3):

- *premarital* (mai rar) – atunci când unul dintre membrii cuplului este afectat de o boală genetică sau are o rudă apropiată afectată; o altă situație este posibilitatea unei uniuni consangvine;
- *preconcepțional* – pentru una dintre situațiile menționate mai sus, la care se adaugă vârsta maternă peste 35 de ani sau existența unor tulburări de reproducere (de exemplu, avorturi spontane repetate);
- *prenatal* – în cazul unei expuneri accidentale la agenți teratogeni sau a descoperirii unor semne ecografice de alarmă;
- *postnatal* – după nașterea unui copil afectat de o boală genetică sau anomalii congenitale.

2. Principii și metodologie

Sfatul genetic necesită cunoștințe, pricepere, abilitate de comunicare, umanism și finețe psihologică. Toate aceste calități se dobândesc și se perfecționează în timp, cu condiția înțelegerii importanței și particularităților acestei acțiuni. Unii geneticieni sau pediatri-geneticieni au remarcabile calități de diagnostic, dar uneori minimalizează complexitatea sau consecințele sfatului genetic; exemplul clasic pentru această abordare simplistă este reprezentat de cazurile de sindrom Down, care sunt „rezolvate" uneori în câteva fraze. Vom încerca să prezentăm sintetic câteva principii și modalități generale de acordare a sfatului genetic, care desigur nu pot fi decât un cadru general ce trebuie dezvoltat prin lectura unor lucrări dedicate acestui subiect și mai ales prin exerciții practice.

8. După Comitetul de Sfat Genetic al Societății Americane de Genetică Umană (1975)

BUCUREȘTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.1. *Principii generale de acordare a sfatului genetic*

(1) Medicul care acordă sfatul genetic (consilierul sau sfătuitorul genetic) trebuie să posede o pregătire *adecvată* în acest domeniu, permanent actualizată, care să-i permită să rezolve toate obiectivele sfatului genetic. Această parte tehnică trebuie dublată de *umanism, capacitate de comunicare şi simţ psihologic.*

(2) *Acurateţea* diagnosticului clinic şi etiologic este elementul esenţial al unui sfat genetic corect pentru că, la fel ca şi în alte specialităţi medicale, *„unde diagnostic nu e, nimic nu e...".*

(3) Şedinţa de consiliere (ce se adresează cel mai frecvent unui cuplu) trebuie *atent pregătită.*

- Se va *planifica* atunci când diagnosticul a fost finalizat şi la un interval de timp suficient după un eveniment traumatizant pentru cuplu (naşterea unui copil malformat, decesul unui copil, pierderea unei sarcini dorite etc.);
  - se vor identifica în prealabil (telefon, vizita asistentului social) *necazurile şi preocupările* consultandului/părinţilor săi (dificultăţile de mobilitate, limbaj, înţelegere, statutul socioeconomic) şi, eventual, dorinţa de a fi sau nu însoţit de cineva din familie sau de un prieten;
  - se va insista asupra *prezenţei ambilor părinţi* sau membri ai cuplului, deoarece nivelul de înţelegere al celor doi părinţi poate fi diferit, iar transmiterea unor date de către părintele prezent spre celălalt părinte poate fi incompletă sau eronată, voit sau nu.
- Se va analiza *dosarul medical* al consultandului/probandului şi vor fi revăzute datele despre boală pentru a stabili ce probleme vor fi discutate.
- O atenţie specială se va acorda acţiunilor ce urmează după sfatul genetic: monitorizarea evoluţiei bolnavului, materiale documentare, legătura cu grupuri de sprijin sau asistenţi sociali, menţinerea legăturii cu medicul şi Centrul de genetică medicală (se va avea în vedere o nouă vizită, după o perioadă de timp).
- Se va aloca un timp adecvat, suficient pentru o primă discuţie, fără întreruperi, telefoane etc.; locul ales trebuie să nu fie stresant, să asigure intimitate şi confidenţialitate; prezenţa eventuală a altor persoane din echipă trebuie motivată şi aprobată de consultanzi.

(4) Explicaţiile oferite trebuie adaptate la *nivelul de înţelegere* al părinţilor, iar limbajul adecvat nivelului lor de cunoştinţe. Pentru un sfat genetic eficient este indispensabil să se realizeze o comunicare reală cu aceştia, astfel ca *părinţii să reţină toate elementele necesare unei percepţii exacte a situaţiei* nou-apărute în viaţa lor. Se vor evita formulări, expresii sau cuvinte greoaie, rare, necunoscute interlocutorilor. Este de preferat un limbaj simplu, exact, clar, fără prea multe noţiuni de specialitate.

(5) Se va acorda o atenţie deosebită *problemelor psihologice* ale sfatului genetic. Riscul genetic are o componentă afectivă atât pentru medic, cât mai ales pentru cuplul care aşteaptă cu nerăbdare şi teamă verdictul medicului. De aceea, se poate spune că *„riscul se calculează la rece şi se transmite cu căldură".*

> Pacienţii şi familiile cu probleme genetice sunt aproape întotdeauna supuşi unui stres emoţional şi social care poate merge până la detrese grave. Unii pacienţi/părinţi au tăria să se confrunte personal cu asemenea probleme; ei preferă să primească orice veste proastă decât să rămână neinformaţi şi iau singuri decizii pe baza informaţiilor ce le obţin. Alţii, reclamă mult mai mult suport şi chiar au nevoie de psihoterapie.

(6) Un aspect deosebit al sfatului genetic este *caracterul non-direcţional*: medicul sfătuieşte cuplul consultand, dar nu ia decizii (nici cel puţin nu le sugerează) în locul acestuia. Important este ca membrii cuplului consultand să conştientizeze toate implicaţiile bolii şi să ia deciziile cunoscând toate informaţiile referitoare la aceasta (vezi capitolul 21.B.1).

(7) Sfatul genetic *nu se termină* o dată cu transmiterea datelor şi riscului, ci include o serie de acţiuni ulterioare.

- Trebuie stabilit cât mai clar posibil dacă pacienţii au înţeles într-adevăr ceea ce li s-a spus despre boală, despre măsurile posibile, despre risc. Este surprinzător că multe informaţii sunt uitate sau greşit interpretate. Un sistem de urmărire periodică (implicând medicul sau/şi un asistent social) este util.
- Totdeauna se va da consultanzilor şi medicului de familie o scrisoare ce sintetizează punctele esenţiale ale consultaţiei, inclusiv riscul, pentru ca pacienţii să poată avea un document de referinţă clar, asupra căruia să revină atunci când consideră că este nevoie să-şi precizeze, explice unele date şi concluzii.
- Sprijinul realizării opţiunilor reproductive decise de către consultanzi.
- Sprijin activ pentru rezolvarea oricărei probleme ulterioare privind îngrijirea bolnavului, planificarea familială, suportul socioeconomic.

2.2. *Probleme ce vor fi puse în discuţie*

Problemele ce vor fi puse în discuţie derivă din obiectivele sfatului genetic. Dar, înainte de orice, consultanzii trebuie să înţeleagă clar scopul şi conţinutul sfatului genetic, la ce se pot aştepta din această acţiune şi ce *sprijin* vor primi; ei vor fi asiguraţi de *confidenţialitatea* datelor şi de *caracterul non-directiv* al informaţiilor: deciziile le aparţin şi trebuie luate pe baza unor elemente clare, bine fundamentate.

- Se va începe *prezentând afecţiunea* probandului sau „problema" cu care se confruntă cuplul, manifestările şi consecinţele ei, evoluţia probabilă (istoricul natural) şi prognosticul bolii, posibilităţile

Tabelul 10.6. Concepții greșite despre afecțiunile ereditare

Absența altor cazuri de boală în familie înseamnă că boala nu este genetică, ereditară, și invers, orice boală familială este genetică.
Orice afecțiune congenitală este și genetică.
Toate bolile genetice sunt ereditare, în sensul de transmitere.
Traumele mentale sau psihice în cursul sarcinii produc malformații.
Toate bolile genetice sunt netratabile.
Un risc de 1:2 ar însemna că tot al doilea copil va fi afectat sau un risc de 1:4 ar însemna că după un copil bolnav următorii 3 copii nu vor fi afectați.
Un risc de 1:20 (de exemplu, pentru spina bifida) înseamnă o șansă din 20 de a avea un copil normal.
Dacă în familie există doar femei sau bărbați afectați, boala are transmitere legată de un cromozom sexual.
Toate bolile genetice pot fi detectate prin analiză cromozomială.

de îngrijire și de prevenire a unor complicații. În fața unui bolnav sau a unor părinți cu un copil bolnav este bine să folosim un ton optimist, încurajator.

- Apoi se va explica *natura genetică* a bolii, mecanismul de producere și modul de transmitere ereditară (vezi și capitolul 9.C.2). În această explicație ne putem confrunta cu o serie de concepții greșite despre ereditate, izvorâte fie din tradiție, fie din ignoranță sau din lipsă de cultură medicală (tabelul 10.6); vom încerca să le limpezim cu tact și răbdare, pentru a reuși să convingem și să lămurim lucrurile.
- *Prezentarea riscului* se va face în toate formele posibile (de exemplu, 25%, ¼ sau 1 din 4), subliniind concomitent gravitatea afecțiunii, posibilitățile terapeutice, șansele unei vieți independente, inserția socială etc. În funcție de acești factori și fără a influența decizia consultanzilor, prezentarea riscului se poate face în mai multe variante – după exemplul „*paharul este pe jumătate gol sau pe jumătate plin*" –, mai ales în funcție de gradul de handicap. Se va preciza că riscurile se referă la viitor, se aplică la fiecare sarcină indiferent de ce s-a întâmplat la celelalte sarcini („*șansa/riscul nu are memorie*"). Multe persoane nu au o idee clară despre ceea ce înseamnă un risc „mare" sau „mic". De aceea, este utilă compararea riscului calculat cu riscurile din populația generală (tabelul 10.7); în felul acesta, riscul va fi mai bine înțeles și impactul mai ușor de suportat.
- Se vor discuta (în aceeași ședință sau ulterior) alternativele și opțiunile reproductive determinate de riscul de recurență sau posibilitățile și opțiunile de testare genetică, avantajele și dezavantajele lor, implicațiile psihologice și sociale, modul de realizare/obținere:
  - alternativele reproductive sunt: contracepția (reversibilă sau definitivă), reproducere asistată (prin donare de gameți), diagnosticul preimplantator sau adopția;
  - opțiunile reproductive includ: diagnosticul prenatal, terminarea sau continuarea unei sarcini cu un făt afectat;
  - opțiunile de testare și acțiunile preventive sunt valabile pentru persoanele cu risc pentru boli cu debut tardiv; o situație specială este testarea stării de purtător sănătos;
  - consultanzii vor fi încurajați să aleagă acțiunile care li se par corespunzătoare în raport cu riscul lor și scopurile familiei.
- O problemă importantă, ce trebuie obligatoriu abordată, este existența altor persoane, rude, cu risc genetic crescut în familie – care rezultă din

Tabelul 10.7. Riscuri în populația generală

Afecțiune	Risc general
Avort spontan	1/5-1/6
Deces perinatal	1/30-1/100
Deces neonatal*	1/150
Deces în primul an de viață*	1/500
Malformații congenitale majore	1/33 sau 2-3%
Handicap mental sau fizic major	1/50 sau 1-2%
Cancer în perioada adultă	1/4 sau 25%

* Datele sunt valabile pentru țările dezvoltate.

DANUBIUS UNIVERSITY LIBRARY

caracterul genetic al bolii şi din datele arborelui genealogic. Consultanzii vor fi încurajaţi să informeze aceste persoane asupra riscului şi utilităţii prezentării la medicul genetician sau dacă nu vor/ nu pot să o facă ei înşăşi, li se va cere acordul scris pentru ca medicul să-i contacteze şi informeze.

3. Riscul genetic în bolile cromozomiale

Sfatul genetic în bolile cromozomiale prezintă dificultăţi legate de tipul anomaliei cromozomiale, sexul pacientului la care este prezentă anomalia, gradul de afectare a reproducerii, modalitatea de segregare a cromozomilor în cursul meiozei şi viabilitatea produşilor de concepţie. Fără a intra în detalii, vom prezenta succint câteva repere practice (vezi capitolul 11).

3.1. Sfatul genetic în anomaliile cromozomiale numerice

În **sindromul Down**, riscul de recurenţă este variabil şi depinde de vârsta maternă în momentul concepţiei (riscul creşte peste 35 de ani) şi de tipul anomaliei cromozomiale, trisomie liberă sau prin translocaţie G/D (risc 1-10%) (detalii în capitolul 11.A.1.1). Cert este că examenul cromozomial este obligatoriu la orice copil cu fenotip clinic sugestiv de sindrom Down, la părinţi dacă bolnavul are o trisomie 21 prin translocaţie, iar diagnosticul prenatal se recomandă la toate gravidele peste 35 de ani, precum şi la gravidele care au avut un copil cu sindrom Down (pentru a exclude un posibil mozaic germinal). În cazul **altor aneuploidii viabile** (trisomiile 13, 18, 45, X, 47,XXY, 47,XYY şi trisomia XXX) riscul de recurenţă este mai mic de 1%. În toate aceste cazuri este indicată efectuarea analizei cromozomiale prenatale, mai mult din motive psihologice.

3.2. Sfatul genetic în anomaliile cromozomiale structurale echilibrate

În anomaliile cromozomiale echilibrate, riscul purtătorului de a avea un descendent cu o monosomie şi/sau trisomie parţială depinde de sexul purtătorului, de cromozomii implicaţi şi de tipul anomaliei. Deseori, în cazul bărbaţilor purtători de anomalii echilibrate între autozomi se poate observa afectarea gametogenezei, ce poate merge până la blocarea ei. În schimb, meioza feminină este rareori afectată de existenţa lor. În toate aceste cazuri diagnosticul prenatal cromozomial trebuie propus deoarece riscul de dezechilibru sau de recurenţă este important.

a) Translocaţiile reciproce echilibrate

În translocaţiile reciproce echilibrate, riscul purtătorului de a avea un descendent cu o anomalie cromozomială structurală neechilibrată este de circa 5-10%, în funcţie de sexul purtătorului, de cromozomii implicaţi şi de tipul anomaliei.

Majoritatea aneuploidiilor parţiale viabile (96%) conţin monosomii parţiale mai mici de 2% sau trisomii parţiale mai mici de 4% din materialul genetic al unui set haploid de cromozomi. Produşii de concepţie cu anomalii cromozomiale parţiale mai severe sunt avortaţi. De aceea, riscul unui purtător de translocaţii ca sarcina să se încheie prin avort spontan este de aproximativ 20-30%. O situaţie particulară apare în cazul existenţei unor translocaţii X-autozom. Jumătate dintre femeile purtătoare şi toţi bărbaţii purtători ai unei astfel de translocaţii sunt sterili. Femeile care sunt fertile prezintă un risc de 20-40% de a avea descendenţi anormali, cu formulă cromozomială neechilibrată.

b) Translocaţiile Robertsoniene

În cazul prezenţei la unul din părinţi a unei translocaţiilor Robertsoniene între cromozomul 21 şi un alt cromozom, riscul de dezechilibru este mai mic de 1% dacă anomalia este prezentă la tată şi de 10-12% dacă este prezentă la mamă. În translocaţiile Robertsoniene între cromozomi 21 riscul de recurenţă este de 100%.

În cazul în care cromozomii 14 şi 15 sunt implicaţi în translocaţia robertsoniană, prezenţa unui cariotip echilibrat (cu sau fără translocaţie) necesită excluderea unei posibile disomii uniparentale pentru aceşti cromozomi, disomie ce rezultă din corectarea mitotică a anomaliei. Disomiile uniparentale, materne sau paterne, ale acestor doi cromozomi determină fenotipuri anormale datorită prezenţei de regiuni amprentate.

c) Inversiile pericentrice

Riscul general al unui pacient cu o inversie pericentrică de a avea un descendent cu anomalie cromozomială neechilibrată datorită recombinării intracromozomiale (vezi figura 7.20) este de circa 5-10%. Riscul de apariţie a unui descendent anormal este direct proporţional cu lungimea fragmentului inversat (ce determină probabilitatea unui CO în bucla de inversiune) şi invers proporţional cu lungimea fragmentelor neinversate. Unele inversii, precum cele ale regiunii heterocromatiniene a cromozomilor 1, 9, 16 ori Y sau inversiile inv(3)(p11-13;q11-12), inv(5)(p13;q13) şi inv(10)(p11.2;q21.2), nu prezintă nici un risc pentru descendenţi.

d) Inversiile paracentrice

Riscul este considerat nul sau foarte mic deoarece, prin *crossing-over*, la nivelul buclei de inversie rezultă

gameți cu cromozomi acentrici sau dicentrici, care de obicei sunt neviabili.

Uneori migrarea centromerelor cromozomului dicentric spre poli diferiți va determina ruperea cromatidei între cei doi centromeri cu formarea de doi cromozomi anormali. În funcție de tipul dezechilibrului și de mărimea fragmentelor implicate fenotipul poate fi viabil, manifestându-se adesea printr-un sindrom polimalformativ (de exemplu, inversia parcentrică pe brațul scurt al cromozomului 8).

e) Inserțiile

Inserțiile reprezintă rearanjările cromozomiale cu cel mai mare risc de un fenotip anormal. Riscul global în inserțiile intracromozomiale este de 15%, dar este posibil ca această cifră să reprezinte o subestimare. În situațiile în care fragmentul inserat este mare, există un risc crescut de recombinare la nivelul segmentului inserat, produșii de concepție cu anomalii cromozomiale neechilibrate fiind, de regulă, neviabili (avorturi spontane), iar riscul pentru descendenți anormali va fi de 0-5%. În cazul în care inserția este de dimensiuni mici, produșii de concepție cu trisomie parțială sunt viabili, iar cei cu monosomie parțială pot fi neviabili, fiind avortați. Într-o astfel de situație, riscul teoretic al unui purtător de inserție de a avea un copil afectat este de aproximativ 33%, în timp ce riscul practic este de 10-20%.

4. Riscul genetic în bolile monogenice

Calcularea riscului de recurență în bolile monogenice este, în principiu, o problemă simplă, în condițiile în care se cunosc principiile de transmitere mendeliene (vezi capitolul 6.D) și genotipurile persoanelor consultate. Totuși, dacă nu se cunosc genotipurile, lucrurile se complică, fiind necesară aplicarea legilor probabilităților și teoremei Bayes.

Calcularea riscului genetic presupune cunoașterea unor elemente de calcul al probabilităților.

Un eveniment se poate realiza cu mai multe probabilități. De exemplu, un părinte heterozigot (**Aa**) poate transmite la un copil fie gena „**A**", fie gena „**a**"; există deci două posibilități, dar numai una din ele se va realiza. Probabilitatea („**p**") a evenimentului „**A**" este identică cu probabilitatea evenimentului "**a**" și egală cu ½ sau, mai general, probabilitatea de a se produce un eveniment este egală cu:

$$p = \frac{\text{numărul cazurilor favorabile}}{\text{numărul cazurilor posibile}} = \frac{n}{N}$$

Probabilitatea producerii unui eveniment este cuprinsă între 0 (imposibilitate) și 1 (certitudine).

Dacă un eveniment (transmiterea genei „**A**", în exemplul de mai sus) nu se produce înseamnă că se realizează fenomenul contrar (transmiterea genei „**a**"), a cărui probabilitate „**q**" este:

$$q = \frac{\text{numărul cazurilor favorabile}}{\text{numărul cazurilor posibile}} = \frac{N-n}{N} = 1 - \frac{n}{N}$$

sau $1 - p$

deci $q = 1 - p$ sau altfel scris: $p + q = 1$; aceasta înseamnă că *probabilitatea tuturor evenimentelor este egală cu 1.*

Calculul probabilităților se bazează pe câteva teoreme și pe legea Hardy-Weinberg.

Teorema probabilităților compuse (legea multiplicării). Dacă pentru realizarea unui eveniment sunt *necesare* două sau mai multe evenimente independente, atunci probabilitatea acestui eveniment este egală cu *produsul* probabilităților individuale de producere a fiecărui eveniment:

$$p = p_1 \times p_2$$

De exemplu, într-o boală recesiv autozomală, probabilitatea unui cuplu sănătos, neînrudit, care provine din familii în care nu există cazuri de boală, de a avea un copil bolnav [P_B] este egală cu produsul a trei probabilități:

- probabilitatea mamei [P_M] de a fi heterozigotă, Na;
- probabilitatea tatălui [P_T] de a fi heterozigot, Na;
- probabilitatea unui cuplu heterozigot de a avea un copil bolnav.

$$P_B = P_M \times P_T \times P_C = 2pq \times 2pq \times \frac{1}{4}$$

unde: P_B – probabilitatea copilului de a fi bolnav, P_M – probabilitatea mamei de a fi heterozigotă, P_T – probabilitatea tatălui de a fi heterozigot, P_C – probabilitatea unui cuplu heterozigot de a avea un copil afectat. P_T și P_M de a fi heterozigoți este 2pq = frecvența heterozigoților în populație (conform legii Hardy-Weinberg), iar P_C = ¼.

Teorema probabilităților totale (legea adunării): dacă un eveniment poate fi realizat prin două sau mai multe evenimente independente, atunci probabilitatea acestui eveniment este egală cu *suma* probabilităților de realizare a fiecăruia dintre evenimentele ce-l pot realiza, produse independent unul de altul.

De exemplu, probabilitatea unui cuplu heterozigot (Na) pentru o boală recesiv autozomală de a avea un copil sănătos (P_{CS}) este egală cu suma probabilității de a avea un copil sănătos homozigot (P_{NN} = 1/4) și a probabilității de a avea un copil sănătos heterozigot (P_{Na} = 1/2).

	N	a
N	NN	Na
a	Na	aa

Teorema probabilităților cauzei sau teorema Bayes ia în considerare toate posibilitățile sau

evenimentele (*probabilitate condiţională*) care modifică probabilitatea iniţială (*probabilitate anterioară*) şi permite calcularea unei probabilităţi corijate (*probabilitate posterioară*) pe baza acestor date. În felul acesta, în calcularea riscului actual se va ţine cont de o serie de evenimente (condiţii) ce pot interveni: penetranţă incompletă, expresivitate variabilă (mai ales privind vârsta de debut), mutaţii *de novo* (în multe boli autozomal dominante sau legate de X), rezultatele unor teste orientative de laborator (de exemplu, dozarea CPK în bolile musculare), număr de copii neafectaţi/afectaţi în familie ş.a.

În cadrul teoremei Bayes sunt luate în calcul patru categorii de probabilităţi:

- **probabilitatea anterioară (P_A)**, reprezintă probabilitatea iniţială a unui eveniment şi se calculează pe baza informaţiilor „anterioare", cum ar fi anamneza familială;
- **probabilitatea condiţională (P_C)**, reprezintă probabilitatea evenimentului în funcţie de anumite condiţii;
- **probabilitatea combinată sau unită** este produsul **($P_A \times P_C$)** dintre probabilitatea anterioară (P_A) şi probabilitatea condiţională (P_C), când cele două situaţii pot apărea împreună, (sau suma lor, când cele două situaţii se exclud reciproc);
- **probabilitatea posterioară sau relativă (P_P)** reprezintă raportul dintre probabilitatea combinată a unui eveniment (de exemplu, de a fi bolnav) şi suma tuturor probabilităţilor combinate ale tuturor posibilităţilor (de exemplu, de a fi bolnav şi de a nu fi bolnav).

De exemplu, dacă notăm cu $P_{(A)}$ probabilitatea anterioară de apariţie a unui eveniment (de exemplu, de a fi bolnav), cu $P_{(NA)}$ probabilitatea anterioară ca acel eveniment să nu apară (de exemplu, de a nu fi bolnav), cu $P_{(C)}$ probabilitatea condiţională ca un al doilea eveniment (de exemplu, prezenţa altor copii sau vârsta de manifestare) să fie asociat cu evenimentul luat în discuţie şi cu $P_{(NC)}$ probabilitatea condiţională ca al doilea eveniment să nu fie asociat cu evenimentul luat în discuţie, atunci probabilitatea posterioară $P_{(P)}$ sau relativă de apariţie a evenimentului luat în discuţie (A) asociat cu cel de-al doilea eveniment este dată de relaţia:

$$P_P = \frac{P_A \times P_C}{[P_A \times P_C] + [P_{NA} \times P_{NC}]}$$

În ultimă instanţă, această formulă reprezintă raportul dintre numărul cazurilor „favorabile" – la numărător – şi numărul total al cazurilor „posibile", la numitor. Aplicarea acestei formule (exemplificată în secţiunile următoare) devine puţin mai clară dacă se construieşte un tabel bayesian:

	Evenimentul A se produce	Evenimentul A nu se produce (NA)
Probabilitate anterioară condiţională combinată	P_A P_C $P_A \times P_C$	P_{NA} P_{NC} $P_{NA} \times P_{NC}$
Probabilitatea posterioară	$P_P = \frac{P_A \times P_C}{[P_A \times P_C] + [P_{NA} \times P_{NC}]}$	

4.1. *Sfatul genetic în bolile autozomal dominante*

Calcularea riscului de recurenţă a afecţiunii în bolile autozomal dominante este uşor de realizat în condiţiile în care boala are *penetranţă completă* şi este lipsită de expresivitate variabilă. În aceste condiţii, riscul este următorul:

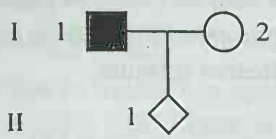
- un cuplu în care un părinte este bolnav heterozigot (An), iar celălalt sănătos (nn) are un risc de 1/2 de a avea un descendent afectat;
- doi părinţi bolnavi heterozigoţi (An) au un risc de 3/4 de a avea un descendent afectat;
- doi părinţi sănătoşi (nn) au un risc aproape nul de a avea un descendent afectat[9].

a) Boli dominante cu penetranţă incompletă

În numeroase boli dominante a fost observat fenomenul de penetranţă incompletă, caracterizat prin absenţa manifestărilor clinice la o parte dintre heterozigoţi. Penetranţa, notată P, reprezintă raportul dintre indivizii afectaţi de o boală dominantă (B) şi indivizii purtători ai genei anormale (AA+An), înmulţit cu 100.

$$P = \frac{B}{AA + An} \times 100$$

Pentru bolile AD cu penetranţă incompletă, la calcularea riscului de recurenţă a afecţiunii trebuie să se ţină cont şi de valoarea P. De exemplu, în cazul unui bolnav (I.1) heterozigot cu o boală AD cu penetranţă de 80% sau 0,8, căsătorit cu o femeie sănătoasă (I.2), riscul de a avea un copil afectat (II.1) va fi dat de produsul ½ × P = ½ × 0,8 = 0,4.

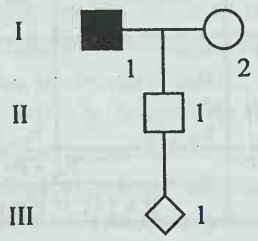


În condiţiile în care un individ sănătos (II.1) are un părinte afectat (I.1) de o boală autozomal dominantă cu penetranţă incompletă şi doreşte să afle riscul

9. Riscul real este egal cu rata mutaţiei genei respective în populaţia generală, dar de obicei acest risc este nesemnificativ.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

copiilor săi de a fi afectați, trebuie aplicată teorema Bayes.



Probabilitate	II.1. heterozigot	II.1. neheterozigot
Anterioară	1/2	1/2
Condițională – clinic normal	1-P	1
Unită/combinată	½ x (1-P)	½ x 1 = ½
Posterioară	$p_{II.1.An} = \frac{\frac{1}{2}(1-P)}{\frac{1}{2}(1-P)+\frac{1}{2}} = \frac{1-P}{2-P}$	

- Rezultă că probabilitatea individului II.1 de a fi heterozigot este (1 – P)/(2 – P).
- Probabilitatea individului III.1 de a fi afectat (B) poate fi determinată calculând produsul următoarelor probabilități: *probabilitatea relativă a individului II.1 de a fi heterozigot (An)* ori *probabilitatea individului III.1 de a moșteni gena A* ori *penetranța.*

$$p_{III.1.B} = \frac{\frac{1}{2}(1-P)}{\frac{1}{2}(1-P)+\frac{1}{2}} \times \frac{1}{2} \times P = \frac{1-P}{2-P} \times \frac{1}{2} \times P = \frac{P-P^2}{4-2P}$$

Folosind formula de mai sus și diferite grade de penetranță, s-a calculat că riscul maxim al unui individ care are un bunic afectat de o boală AD cu penetranță redusă, în condițiile în care tatăl (mama) este clinic sănătos (sănătoasă), nu depășește valoarea de 0,086 sau 1/12.

b) Expresivitatea variabilă

O mare parte dintre bolile autozomale dominante se caracterizează prin expresivitate variabilă, persoanele bolnave din familii diferite sau chiar din aceeași familie având un *grad diferit de afectare*. În aceste condiții, persoanele mediu afectate își pun problema care este riscul descendenților lor de a avea o formă gravă de afectare. Acest risc poate fi ușor de calculat în condițiile în care incidența în populație a formei severe de afectare este cunoscută. În această situație, se aplică următoarea formulă:

$$p = \frac{1}{2} \times \text{incidență (\%)}$$

c) Boli autozomal dominante cu debut tardiv

Mai multe boli AD se caracterizează prin debut la vârste variabile în viața adultă (boala Huntington, ADPKD, hipercolesterolemia familială etc.). Pentru boala Huntington au fost calculate probabilitatea manifestării bolii la diferite vârste și probabilitatea unui individ de a fi purtător de genă mutantă (heterozigot) dacă este clinic neafectat (tabelul 10.8).

Tabelul 10.8. Riscuri aproximative la diferite vârste pentru persoane clinic neafectate de a fi heterozigoți pentru boala Huntington

Vârsta (ani)	Probabilitatea detectării expresiei genice	Probabilitatea de a fi heterozigot dacă este clinic sănătos
20	0,02	0,49
25	0,05	0,48
30	0,10	0,47
35	0,20	0,44
40	0,30	0,41
45	0,35	0,39
50	0,50	0,33
55	0,65	0,26
60	0,75	0,20
65	0,85	0,13
70	0,95	0,05

De exemplu, un bărbat în vârstă de 60 de ani (II-1) are mama (I-1) decedată de boala Huntington. Probabilitatea sa inițială de a fi heterozigot este de 50% sau 0,5; ea se modifică, conform teoremei Bayes, ținând cont de faptul că la 60 de ani este neafectat, astfel că probabilitatea posterioară de a fi heterozigot, în aceste condiții, este de 0,20.

	Pacientul este heterozigot normal	Pacientul este homozigot normal
Probabilitatea Anterioară	0,5	0,5
Condițională (sănătos la 60 ani)	0,25	1
Combinată	0,5 x 0,25 = 0,125	0,5 x 1 = 0,5
Probabilitatea posterioară	0,125/ (0,125+0,5) = 0,2	

d) Boli autozomal dominante cu anticipație

Într-o serie de afecțiuni dominant autozomale a fost evidențiat fenomenul de anticipație, caracterizat prin debutul mai precoce și existența unei forme de boală mai gravă la descendenții unei persoane afectate. Majoritatea acestor afecțiuni sunt determinate de mutații dinamice, caracterizate prin amplificarea unor repetiții trinucleotidice în cursul meiozei indivizilor afectați, astfel încât descendenții lor moștenesc un număr sporit de repetiții.

Calcularea riscului în astfel de afecțiuni se poate realiza doar în mod empiric, deoarece la momentul actual nu există nici o metodă concretă de apreciere a riscului.

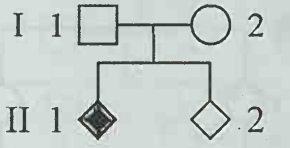
BCU "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

De exemplu, în boala Huntington, determinată de amplificarea unei secvenţe CAG, au fost stabilite, pe baza datelor epidemiologice, următoarele corelaţii: 40 trinucleotide – vârstă de debut 56 de ani; 45 trinucleotide – vârstă de debut 37 de ani; 50 trinucleotide – vârstă de debut 26 de ani, dar totuşi nu se pot face estimări exacte.

4.2. *Sfatul genetic în bolile autozomal recesive*

În general, calcularea riscului de recurenţă şi acordarea sfatului genetic într-o afecţiune cu transmitere autozomal recesivă este relativ uşor de realizat, pe baza datelor din arborele genealogic şi legea Hardy-Weinberg, care permite calcularea frecvenţei heterozigoţilor (2pq) (vezi capitolul 8.A.2). Dacă, de exemplu, o boală are o frecvenţă populaţională de 1 la 10.000, atunci $q^2 = 1/10.000$, $q = 1/100$, iar $2pq = 2 \times 99/100 \times 1/100 = 1/50$.

În condiţiile în care copilul afectat (II1) al unui cuplu sănătos (I1-I2) este homozigot **aa**, cei doi părinţi sunt obligatoriu heterozigoţi **Na**. Riscul lor de a avea un alt copil afectat este de **1/4**, iar probabilitatea fiecărui descendent sănătos al cuplului de a fi heterozigot **Na** este de **2/3**.



	N	a
N	NN	Na
a	Na	aa

O situaţie frecvent întâlnită în cazul acordării sfatului genetic este aceea în care medicul trebuie să calculeze riscul unui descendent cu o boală autozomal recesivă în cazul căsătoriei între un individ care provine dintr-o familie afectată şi o persoană provenind din populaţia generală. Condiţia obligatorie ca doi indivizi sănătoşi să aibă un copil afectat de o boală autozomal recesivă este ca ambii membri ai cuplului să fie heterozigoţi. Pentru individul care provine din populaţia generală, probabilitatea de a fi heterozigot este de **2pq** sau $2 \times \sqrt{\text{frecvenţa bolii}}$. În cazul persoanei care provine din familia în care există cazuri de boală, calcularea probabilităţii de a fi heterozigot depinde de gradul de înrudire cu individul afectat (figura 10.5, tabelul 10.9). În aceste condiţii, calcularea riscului de recurenţă a bolii se poate face simplu, folosind produsul probabilităţilor. De exemplu, dacă luăm în considerare un cuplu (figura 10.6) în care fratele soţului (II.1) este afectat de fenilcetonurie, iar soţia (II.3) provine din populaţia generală – în care frecvenţa bolii este de 1/10.000, iar frecvenţa heterozigoţilor este 1/50 –, riscul acestui cuplu de a avea un copil (III.1) afectat este:

$$P_{III\text{-}1} = P_{M(Na)} \times P_{T(Na)} \times 1/4 =$$
$$= 1/50 \times 2/3 \times 1/4 = 1/300.$$

Tabelul 10.9. Probabilitatea de a fi heterozigot *Na* a rudelor unui individ bolnav *aa*

Relaţie	Na
Părinţi, copii	1
Frate, soră	2/3
Bunici, unchi, mătuşi, nepoţi de la copii	1/2
Nepoţi de la frate sau soră	1/3
Verişori primari	1/4
Copiii verişorilor primari	1/8

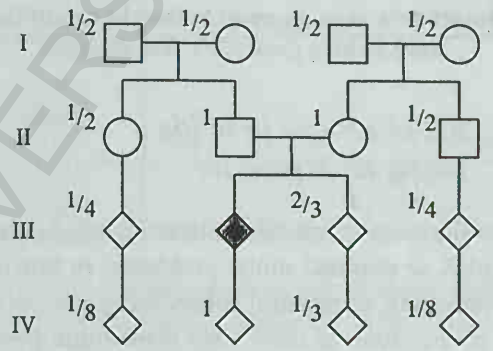


Figura 10.5. Probabilitatea de a fi heterozigot a membrilor unei familii în care există un caz de boală recesiv autozomală

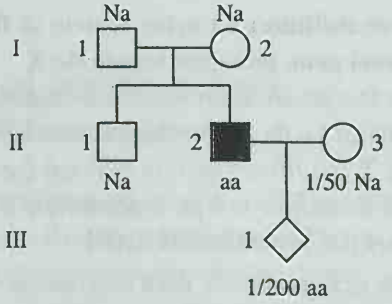


Figura 10.6. Riscul unei persoane afectate de o boală recesiv autozomală de a avea un copil afectat

O altă situaţie particulară apare atunci când un individ afectat de o boală autozomal recesivă doreşte să afle riscul de a avea descendenţi afectaţi (aa). În acest caz, riscul se calculează în felul următor:

$$P_{C(aa)} = P_{T(a)} \times P_{M(a)} = 1 \times 1/2\ P_{M(Na)}$$

În cazul bolilor cu transmitere autozomal recesivă, riscul de recurenţă a bolii creşte la cuplurile consangvine, deoarece cei doi membri ai cuplului posedă o serie de alele identice (inclusiv gene mutante), moştenite de la un strămoş comun. De aceea, ei au o probabilitate crescută de a transmite gena mutantă la descendenţi, care vor fi homozigoţi *aa* afectaţi. De exemplu, în cazul căsătoriei între doi veri primari

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

care au avut un bunic afectat de o boală autozomal recesivă, riscul de recurență a bolii la descendenți este de 1/16 (figura 10.7).

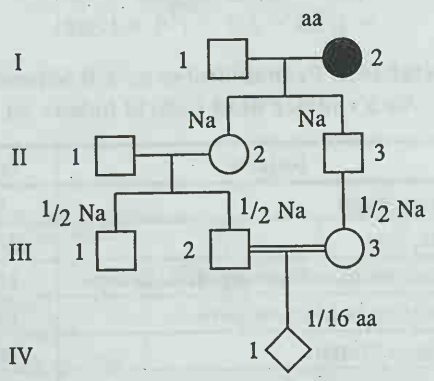


Figura 10.7. Riscul unui cuplu format din doi veri primari de a avea un copil bolnav în condițiile în care bunica comună a fost afectată

4.3. *Sfatul genetic în bolile legate de X recesive*

În bolile recesive cu transmitere legată de cromozomul X se pun mai multe probleme, în funcție de rata mutațiilor, de numărul bolnavilor, al copiilor sănătoși și, eventual, al unor teste disponibile pentru a stabili (cu un anumit grad de relativitate) starea de purtător. Ele pot fi rezolvate adecvat recurgând la teorema Bayes.

a) Probabilitatea ca orice femeie să fie purtătoarea unei gene mutante legate de X

Orice femeie are o *probabilitate inițială* (anterioară) egală cu 4 μ de a fi purtătoarea unei boli recesive legate de X (cu *fitness* zero la bărbați) (unde μ este frecvența mutațiilor noi pe cromozomul X patern). Valoarea 4 μ a fost calculată astfel:

– femeia ar fi purtătoare dacă moștenește o mutație nouă pe cromozomul X patern (ν) sau dacă moștenește o mutație nouă pe cromozomul X matern (μ). Dacă acceptăm o rată egală a mutațiilor la bărbați și la femei (ambele reprezentate prin μ), fiecare femeie are un risc de 1/2 din riscul mamei plus suma ratei mutației la bărbați (μ) și femei (ν) sau 2 μ (deoarece μ = ν). Aceasta conduce la formularea unei serii infinite în care riscul va deveni 4 μ:

Risc = 2 μ+ 1/2 (2 μ) + 1/4 (2 μ) + 1/8 (2 μ) etc.

mutație nouă la consultandă
mutație nouă la mamă
mutație nouă la bunică
mutație nouă la străbunică

Această serie poate fi rearanjată plasând 2 μ în afara parantezelor: 2μ (1+1/2+1/4+1/8+...), relație care, după un număr infinit de generații, devine 2 μ (2), adică 4 μ.

b) Probabilitatea ca mama unui caz izolat să fie purtătoare

Se poate calcula aplicând teorema Bayes:

	Ipoteza I Mama purtătoare	Ipoteza II Mama nepurtătoare
Probabilitate anterioară (inițială)	4 μ	1 - 4μ ≈ 1
condițională	½	μ
combinată (unită)	4μ x ½ = 2μ	1 x μ = μ
Probabilitate posterioară (relativă)	$\frac{2\mu}{2\mu+\mu}=\frac{2}{3}$	$\frac{\mu}{2\mu+\mu}=\frac{1}{3}$

În funcție de probabilitatea 2/3 a mamei de a fi purtătoare, se poate calcula probabilitatea altor femei din familie (figura 10.8) de a fi heterozigote.

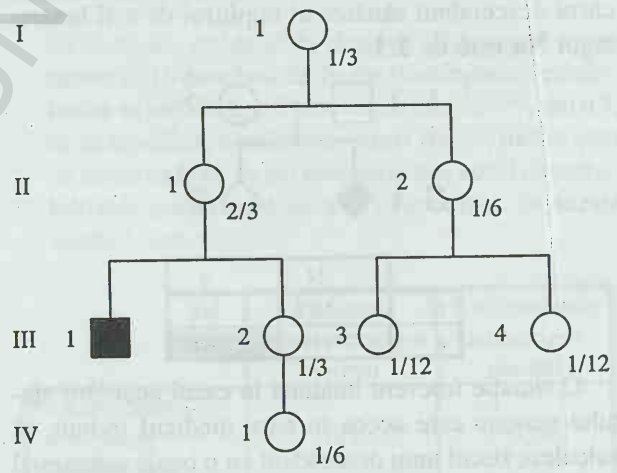


Figura 10.8. Probabilitățile rudelor de sex feminin ale unui bonav, cu o afecțiune recesivă de X, de a fi heterozigote

c) Probabilitatea unei femei de a fi heterozigotă dacă are mai mulți copii neafectați

O femeie (III.2) ai cărei frate (III.3) și unchi matern (II.3) sunt afectați de distrofie musculară Duchenne dorește să afle riscul de a avea un băiat bolnav (IV.4), în condițiile în care are deja trei băieți sănătoși (IV.1, IV.2, IV.3) (figura 10.9).

În această situație, dacă facem abstracție de cei trei băieți sănătoși ai consultandei, riscul ei de a avea un băiat bolnav ar fi de 1/4, deoarece probabilitatea inițială (anterioară) a femeii de a fi heterozigotă este de 1/2, iar probabilitatea ei de a transmite gena anormală la băieți este de asemenea 1/2. Pentru a afla care este probabilitatea reală (posterioară) a femeii

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de a fi heterozigotă, având deja trei copii sănătoşi (probabilitate condiţională), aplicăm teorema Bayes:

	III-3 este heterozigotă	III-3 nu este heterozigotă
Probabilitatea anterioară condiţională (3 copii sănătoşi)	1/2 1/2x1/2x1/2=1/8	1/2 1 x 1 x 1 = 1
combinată	1/2 x 1/8 = 1/16	1/2 x 1= 1/2
Probabilitate posterioară	1/2 x 1/8 / (1/2 x1/8) + (1/2 x 1) = 1/9	

Ţinând cont de această probabilitate posterioară (relativă), rezultă că riscul copilului de IV.4 de a fi afectat este 1/2 × 1/9 = 1/18, mult mai mic decât cel de 1/4 obţinut fără a ţine cont de datele suplimentare furnizate de analiza arborelui genealogic.

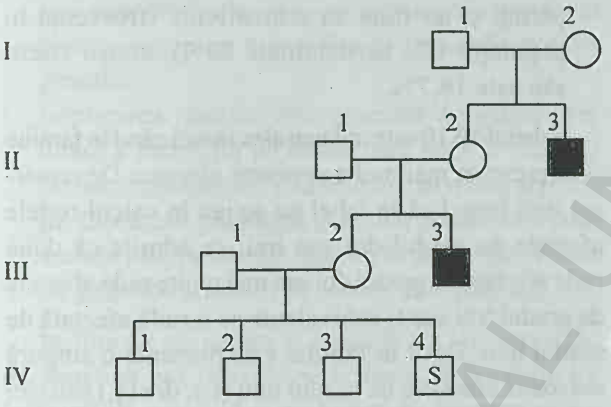


Figura 10.9. Arborele genealogic al unei familii în care există cazuri de distrofie musculară Duchenne

d) Probabilitatea unei femei de a fi heterozigotă pentru o boală legată de X recesivă în familiile în care există mai mulţi bolnavi

În familiile în care există mai multe cazuri de boală legată de X recesivă, riscul unei femei de a fi heterozigotă se poate calcula de asemenea cu ajutorul teoremei Bayes, în funcţie de probabilitatea mamei sale de a fi purtătoare. Examinând figura 10.10.a, se observă că probabilitatea femeii III.4 de a fi heterozigotă, ştiind că mama ei este cert heterozigotă, este de ½. Pentru arborele genealogic din figura 10.10.b, fără a aplica teorema Bayes, se observă că persoana III.4 are o probabilitate de ¼ de a fi heterozigotă, ştiind că bunica sa maternă este cert heterozigotă, iar mama ei (II.4) are o probabilitate de ½ de a fi heterozigotă. Trebuie însă să luăm în considerare faptul că femeia II.2 are trei băieţi sănătoşi şi să aplicăm teorema Bayes:

	Ipoteza I Femeia II.2 purtătoare	Ipoteza II Femeia II.2 nepurtătoare
Probabilitate anterioară condiţională	1/2 $(1/2)^3=1/8$	1/2 1
combinată	1/2 x 1/8 = 1/16	1/2 x 1 = 1/2
Probabilitate posterioară	$\frac{1/16}{1/16+1/2}=\frac{1/16}{9/16}=\frac{1}{9}$	

Se poate observa că, în aceste condiţii, probabilitatea femeii II.2 de a fi purtătoare este de 1/9 (≈ 11%), iar cea a fiicei sale de 1/9 × 1/2 = 1/18 (≈ 5,5%), mult mai mică decât cea de ¼ (25%) obţinută făcând abstracţie de faptul că mama sa a născut 3 băieţi sănătoşi.

5. Riscul genetic în bolile multifactoriale

Bolile multifactoriale au un determinism mixt, genetic şi ecologic, dar mecanismul patogenic nu este încă descifrat. Participarea unor factori genetici (vezi capitolul 6.E.2) implică *un risc de recurenţă care însă nu poate fi calculat*. De aceea, evaluarea riscului se

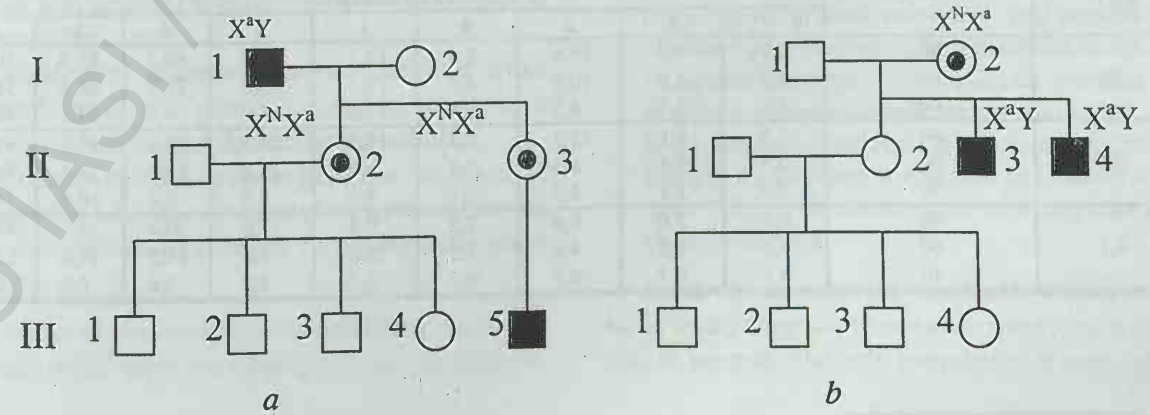


Figura 10.10. Arborii genealogici ai unor familii în care există mai multe cazuri de boală cu transmitere recesivă legată de cromozomul X

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

bazează pe *date empirice* rezultate din studii populaționale pe un număr mare de familii în care există unul sau mai mulți bolnavi. În aceste condiții, pentru acordarea sfatului genetic în bolile multifactoriale (anomalii congenitale, unele boli comune ale adultului) trebuie respectate o serie de principii generale.

- Riscul empiric reprezintă *un risc mediu* pentru boala respectivă în populația din care face parte probandul și astfel este posibil ca în familia studiată riscul mediu să nu fie identic cu cel real.
- În general, riscul empiric de recurență în fratrie sau descendență pentru malformațiile congenitale izolate, cu o frecvență ≥ de 1 la 1.000 de nou-născuți, este de circa 2-5%; pentru bolile comune, cu o frecvență ≥ de 1 la 100, riscul este de circa 10%.
- Riscul de recurență a afecțiunii este influențat de o serie de factori:
  - *Gradul de rudenie cu probandul.* Riscul de recurență la rudele de gradul I este mult mai mare decât la alte persoane din familie; de exemplu, descendenții și frații unui proband cu despicătură labială[10] au un risc de 3,15 și respectiv de 2,79; rudele de gradele doi și trei au riscuri mult mai mici, de 0,47% și, respectiv, 0,27%.
  - *Prezența unei forme mai severe de boală la proband.* Dacă probandul are o despicătură labială unilaterală, riscul la frați este 1,9%; el crește la 6,6% dacă probandul are o despicătură labială și palatină bilaterală.
  - *Prezența în familie a mai multor indivizi afectați.* În cazul despicăturilor labiale, dacă sunt afectați doi frați, riscul la următoarea naștere este de 10%; dacă sunt afectați un părinte și un copil, atunci riscul pentru un alt copil afectat este de circa 14%.
  - *Sexul probandului.* Riscul crește dacă în familie există bolnavi de un anumit sex la care boala respectivă este, în mod normal, mai puțin frecventă (de exemplu, luxația congenitală de șold la băieți sau stenoza pilorică la fete).
  - *Consangvinitatea în căsătorie.*
- În cazul în care pentru anumite boli multifactoriale nu există informații privind riscul empiric pentru o populație dată[11], se poate recurge la riscurile calculate în tabelul 10.10 pe baza frecvenței în populație și a *heritabilității* afecțiunii respective, precum și a numărului de persoane afectate (aceste date și multe altele se găsesc în programul computerizat RISKMF, elaborat de Charles Smith, 1972). De exemplu, dacă din anamneza familială a unui consultand rezultă că unul dintre părinți și un frate au schizofrenie (frecvența în populație 1%, heritabilitate 80%), atunci riscul său este 18,7%.

Tabelul 10.10 este util mai ales atunci când în familie sunt prezente mai multe persoane afectate. De remarcat însă faptul că în tabel nu se iau în calcul rudele afectate de gradul doi sau trei; se admite că două rude afectate de gradul doi sau mai multe rude afectate de gradul trei vor fi echivalente cu o rudă afectată de gradul unu. Dacă în familie este prezentă o singură persoană afectată, de gradul unu (I_1), doi (I_2) sau trei (I_3), riscul poate fi estimat folosind formulă elaborată de Edwards (1976):

$$I_1 = P^{1/4},\ I_2 = P^{3/4},\ I_3 = P^{7/8}$$

Tabelul 10.10. Riscuri de recurență în boli multifactoriale
(după Smith, 1972)

Frecvența În populație (%)	Heritabilitate (%)	Părinți afectați								
		0			1			2		
		Frați afectați								
		0	1	2	0	1	2	0	1	2
1,0	80	0,9	6,7	14,6	8,5	18,7	27,9	40,3	45,9	50,6
	60	1,0	4,9	10,6	5,7	12,3	19,2	21,7	28,3	34,1
	40	1,0	3,3	6,5	3,5	7,0	1,2	9,7	14,1	18,7
0,5	80	0,5	5,1	12,3	6,2	15,5	24,3	37,6	43,2	47,9
	60	0,5	3,4	8,4	3,8	9,5	15,8	18,1	24,4	30,0
	40	0,5	2,1	4,7	2,2	4,9	8,3	7,0	10,8	14,9
0,1	80	0,1	2,6	8,4	2,9	9,8	17,6	30,4	36,7	41,2
	60	0,1	1,5	4,6	1,5	5,0	9,6	11,5	17,1	22,2
	40	0,1	0,7	0,7	0,7	2,2	4,2	3,6	6,0	8,7

10. Datele folosite ca exemplificare provin din studiul familial al despicăturii labiale ± palatine efectuat de Carter *et al.*, 1982.
11. Pentru unele afecțiuni – ca, de exemplu, defectele de tub neural – există variații geografice și temporale importante ale riscului empiric.

BCU IASI / CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

D. Serviciile de genetică clinică

1. Definiţie

Serviciile de genetică sunt servicii medicale *specializate* pentru a ajuta (medical şi psihologic) pacienţii cu boli genetice sau anomalii congenitale (indiferent de cauză), precum şi *familiile* lor „*...să trăiască şi să se reproducă cât mai normal posibil*" (OMS, 1985, 1996).

- Patologia genetică şi malformativă poate afecta *orice sistem de organe*, se manifestă la *orice vârstă* şi necesită *teste speciale* de diagnostic, complet diferite de alte analize de laborator clinic. Aceste trei caracteristici determină complexitatea serviciilor de genetică medicală şi necesitatea unei *echipe multidisciplinare* de profesionişti, cadre medicale sau non-medicale, care să acţioneze *coordonat* pentru îngrijirea bolnavilor şi prevenţia bolilor genetice.
- Implicarea *familiei* este generată de natura ereditară a factorilor de boală, care trebuie evaluaţi la rudele bolnavului, eventual în mai multe generaţii. Deoarece patologia genetică poate avea consecinţe asupra întregii familii, în cadrul serviciilor de genetică *unitatea de studiu este familia.*

În funcţie de natura şi obiectivele lor, serviciile de genetică pot fi axate pe bolnavi şi familiile lor (servicii de genetică clinică) sau pe întreaga populaţie (servicii de genetică comunitară sau de sănătate publică).

2. Obiective

Serviciile de genetică clinică, bazate pe indivizi/familie, au următoarele obiective:

- rezolvarea problemelor medicale (diagnostic, îngrijire, sfat genetic) şi psihologice ale bolnavilor şi familiilor lor;
- identificarea şi supravegherea indivizilor şi/sau familiilor cu risc genetic crescut cu scopul de a creşte şansele unor descendenţi sănătoşi;
- evaluarea riscului ca unele persoane sănătoase să dezvolte o boală monogenică cu debut tardiv sau o afecţiune multifactorială cu predispoziţie genetică.

Serviciile de genetică comunitară, axate pe întreaga populaţie şi/sau subgrupe de risc (de exemplu, grupe etnice), urmăresc *profilaxia primară* (evitarea cauzelor), *secundară* (depistarea precoce) şi *terţiară* (reducerea consecinţelor, prevenirea complicaţiilor) a bolilor genetice şi anomaliilor congenitale la nivel populaţional (vezi capitolul 18). În acest scop, se folosesc **programe de sănătate publică** axate pe: *screening*-ul şi urmărirea prenatală şi neonatală, identificarea precoce, monitorizarea şi urmărirea defectelor congenitale, serviciile de informare (educaţie) şi evaluare a teratogenilor, *screening*-ul populaţiilor selecţionate.

3. Organizare[12]

Organizarea eficientă a serviciilor de genetică medicală trebuie să se bazeze pe trei principii: *prioritate*, *regionalizare* şi *integrare*. Înfiinţarea şi dezvoltarea unor servicii de genetică medicală în România este o *prioritate* absolută, ţinând cont de ponderea şi consecinţele patologiei genetice (vezi capitolul 9.C.3), precum şi de situaţia actuală.

Soluţia optimă – recomandată de OMS şi Societatea Europeană de Genetică umană – este o *reţea naţională* de centre regionale de genetică medicală (unităţi terţiare) şi cabinete de genetică medicală (sateliţi în spitalele judeţene) – unităţi secundare – conectate cu unităţile de asistenţă primară, medicii de familie, baza reţelei. Cu alte cuvinte, activităţile de genetică medicală vor fi organizate, într-*o manieră ierarhizată şi coordonată*, la toate cele trei niveluri de asistenţă medicală, pentru a profita la maximum de resursele existente. Realizarea unor legături bidirecţionale, în trepte, între cele trei niveluri de asistenţă genetică este decisivă pentru eficienţa lor.

Această schemă de organizare a serviciilor de genetică medicală – rezultată prin analizele efectuate de către experţi, la nivel european – mai prevede două elemente: *integrarea* serviciilor de genetică cu alte servicii înrudite (asistenţă preconcepţională, prenatală, neonatală, servicii speciale dedicate anumitor boli) şi *înfiinţarea* unor unităţi naţionale speciale de diagnostic sau îngrijire a unor anumite categorii de bolnavi; acreditarea CGM şi coordonarea lor va fi asigurată de un Consiliu Naţional.

Centrele de genetică medicală (CGM) trebuie să fie unităţi *integrate* într-un mare spital (centru terţiar), care să permită colaborări interclinice de mare calitate,

12. Datele sintetice prezentate în această secţiune se bazează pe Recomandările Societăţii Europene de Genetică Umană, *Provision of genetic services in Europe – current practices and issues* (2001).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

explorări clinice şi paraclinice complete; ele trebuie să fie dotate cu *capacităţi proprii de explorare* la nivel cromozomial, biochimic, molecular.

> Fiecare centru va acoperi o regiune definită, de 1,5-3 milioane de locuitori. Numărul de medici geneticieni va fi de 2-3 la un milion de locuitori, iar stafful de laborator (de obicei ne-medical) de 4 la un milion. La această echipă se vor adăuga alte cadre superioare şi medii, *medicale* şi *nemedicale* (psihologi, asistenţi de genetică, asistenţi sociali, informaticieni etc.). Nu în ultimul rând, CGM trebuie să aibă o logistică solidă, resurse bioinformatice şi comunicaţii, o bibliotecă cuprinzătoare.

Furnizarea de servicii medicale genetice de calitate (consult, explorare, sfat genetic) se va face de către cadre specializate, pe baza unor *ghiduri clinice* sau *protocoale de laborator standard* pentru cea mai bună practică, disponibile pe website-uri. Va funcţiona un *control de calitate*, intern şi extern, pentru clinică şi laboratoare, precum şi un sistem eficient de *educaţie medicală continuă*.

Aceste reguli profesionale vor fi obligatoriu dublate de o *acoperire financiară* adecvată, de către Ministerul Sănătăţii şi Casele de asigurări de sănătate. CGM trebuie să posede toate resursele necesare unui diagnostic de calitate, decisiv pentru îngrijirea bolnavului şi familiei. Consultul şi sfatul genetic pare scump, consumator de timp, iar testele genetice sunt costisitoare. Totuşi, deoarece un individ sau o familie nu au prea des nevoie de servicii genetice (testele genetice se fac *o dată în viaţă*), iar beneficiile pe termen lung sub aspectul diagnosticului corect (care elimină alte explorări), prevenţiei şi tratamentului adecvat sunt importante, sfatul genetic este în ansamblu economic si eficace.

4. Funcţii

a) Consultaţii genetice

Serviciile de genetică clinică se ocupă de obicei cu diagnosticul clinic, paraclinic şi genetic în bolile monogenice, anomaliile cromozomiale, sindroamele plurimalformative cu sau fără retard mental, tulburările de reproducere; mai recent, graţie tehnicilor noi de genetică moleculară, au apărut noi preocupări: *testele predictive* pentru bolile neurogenetice şi cancerele ereditare/familiale; deşi aceste cancere constituie o mică parte din toate cancerele, ele reprezintă un număr considerabil de cazuri în comparaţie cu bolile rare văzute de obicei de medicii geneticieni.

Deoarece bolile genetice sunt foarte numeroase, iar diagnosticul lor este deseori dificil, singura cale de a acorda servicii corecte este de a perfecţiona experienţa specialiştilor de genetică clinică şi sindromologie, de a cunoaşte utilizarea perfectă a bazelor de date specializate, accesibile pe Internet sau CD-ROM, şi de a consulta alţi specialişti, folosind poşta electronică sau, în viitor, teleconsultaţiile.

b) Informare şi sfat genetic

Acordarea sfatului genetic este o caracteristică definitorie a serviciilor de genetică clinică şi o componentă obligatorie a evaluării genetice.

Acest proces implică o încercare de a ajuta individul sau familia pentru:

- a înţelege faptele medicale, inclusiv diagnosticul, evoluţia probabilă a bolii şi posibilităţile de îngrijire;
- a aprecia cum contribuie factorii genetici la producerea bolii şi care este riscul de recurenţă la rudele bolnavului;
- a înţelege opţiunile reproductive corelate cu acest risc de recurenţă;
- a alege acţiunile care sunt corespunzătoare pentru ei în raport cu mărimea riscului, scopurile familiei şi a acţiona în concordanţă cu această decizie informată;
- a face tot ce este posibil pentru corectarea afecţiunii şi/sau reducerea riscului ei.

Problemele tehnice şi etice ale sfatului genetic au fost discutate în secţiunea precedentă; vom sublinia doar necesitatea unui limbaj adecvat, discuţii repetate şi, în final, *o informare scrisă*. Pacienţilor li se va facilita *accesul la alte materiale informative* despre boală, precum şi la *grupurile de sprijin*.

c) Diagnostic prenatal (DPN)

DPN a devenit o activitate constantă a serviciilor de genetică din următoarele raţiuni:

- în condiţiile extensiei evaluării ultrasonografice a fătului în practica medicală este necesară *interpretarea datelor prenatale* (semne de alarmă) care pot reflecta o boală genetică sau un defect sever de altă natură;
- DPN este recomandat familiilor cu risc crescut de boli genetice care pot fi detectate prenatal; testele de DPN trebuie însă precedate de un sfat genetic adecvat, preferabil înaintea unei noi sarcini, ocazie cu care se vor discuta toate opţiunile reproductive, riscurile şi incertitudinile DPN;
- dacă este diagnosticată prenatal o boală genetică, familia are opţiunea de a continua sau nu sarcina; în prima situaţie se vor lua măsuri adecvate de urmărire a sarcinii şi asistenţă specială a nou-născutului; în a doua situaţie, după întreruperea sarcinii şi analiza fătului se vor discuta cu familia riscurile de recurenţă şi opţiunile posibile.

d) Testare genetică

Fără a intra acum în detalii (vezi capitolul 19), vom preciza că dezvoltarea metodelor de diagnostic

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

molecular a permis introducerea în practica medicală a *testării presimptomatice* – pentru boli ce debutează mai târziu în cursul vieții (un test anormal indică dezvoltarea aproape invariabilă a bolii, la o anumită vârstă) –, precum şi a *testării predictive* – termen ce are un sens mai larg, referindu-se la situații în care riscul de boală este crescut, fără a implica un grad de certitudine. Ambele testări dau informații asupra *statusului viitor de sănătate al unei persoane sănătoase.*

e) Alte activități

- Asigurarea unei *asistențe efective, continue* şi *anticipative* a bolnavilor şi a persoanelor sănătoase cu risc.
- *Păstrarea* corectă şi confidențială a datelor genetice ale pacienților (fişe de consult genetic, buletine de analize, protocoale de îngrijire, buletine de sfat genetic).
- Realizarea de *Registre genetice* pentru anomalii congenitale sau pentru anumite boli ereditare frecvente (vezi capitolul 19).
- *Formarea de* specialişti în genetică medicală şi educația medicală continuă.
- *Educarea genetică* a studenților, medicilor de familie, altor specialişti, asistentelor medicale sau personalului non-medical.
- Unele *programe de genetică comunitară.*
- Cercetare.
- Monitorizarea continuă a eficienței şi calității serviciilor clinice şi de laborator.

5. Principii etice

Din punct de vedere etic (vezi capitolul 21), activitățile serviciilor de genetică vor fi bazate pe principiul *autodeterminării persoanei interesate*; orice test genetic, inclusiv testele genetice sistematice, nu se vor face fără un *consimțământ liber* şi *informat*; nu se va pune nici o condiție pentru acceptarea sau efectuarea testelor genetice. O atenție specială se va acorda testării minorilor şi persoanelor cu retard mental, la care investigația va fi permisă numai atunci când este necesară pentru sănătatea lor sau dacă informațiile sunt absolut necesare pentru diagnosticul unei boli genetice la membrii familiei lor.

Familiile vor decide singure dacă doresc sau nu sfat genetic şi vor alege liber unde să meargă pentru sfat. *Caracterul non-direcțional* al sfatului genetic va fi o regulă generală.

Confidențialitatea are o importanță decisivă, şi pacienții vor trebui să fie întrebați dacă sunt de acord ca rezultatele testelor lor să fie făcute cunoscute şi de alți membri ai familiei, explicându-le că transmiterea acestor informații este spre binele tuturor. Oricum se va garanta *confidențialitatea pentru familie mai curând decât pentru individ* (ținând cont de caracterul familial al bolilor genetice).

Bibliografie specifică selectivă

1. *** Genetic Interest Group. *Guidelines for genetic services.* Londra, 1998.
2. *** Royal College of Physicians. *Clinical genetics services activity, outcome, effectiveness and quality.* Londra, 1998.
3. *** Royal College of Physicians. *Clinical genetics services into 21st century.* Londra, 1996.
4. *** WHO/WAOPAD. *Services for the Prevention and Management of Genetic Disorders and Birth Defects in Developing Countries.* Report of a joint WHO/WAOPBD întâlnirea de la Haga, 5-7 ianuarie 1999.
5. Baker DL, Schuette JL, Uhlmann WR. *A guide to genetic counseling.* Wiley-Liss, New York, 1998.
6. Bates B. *A guide to physical examination.* ed. a III-a. Lippincott, Philadelphia, 1983.
7. Bennett RL, Steinhaus KA, Uhrich SR *et al. Recommandations for standardized human pedigree nomenclature.* Am J Hum Genet 1995; 56:745-752.
8. Bennett RL. *The practical guide to the genetic family history.* Wiley-Liss, New York, 1999.
9. Burke W. *Genetic testing.* N Engl J Med 2002; 347:1867-1875.
10. Evans CD. *Computers system in dysmorphology.* Clin Dysmorphol 1995; 4:185-201.
11. Firth HV, Hurst JA, Hall JG. *Oxford desk reference – Clinical genetics.* Oxford University Press, 2005.
12. Gibbs JR, Singleton A. *Application of genome-wide single nucleotide polymorphism typing: simple association and beyond.* PLoS Genet 2006 oct 6; 2(10):e150.
13. Hall BD. *State of the art of dysmorphology.* Am J Dis Child 1993; 147:1184-1189.
14. Harris R, Reid M. *Medical Genetic Services in 31 countries: on overview.* Europ J Hum Genet 1997; 5(suppl.2):3-21.
15. Jones KL (ed). *Smith's recognozable pattern of human malformation.* ed. a V-a. W.B. Saunders, Philadelphia, 1997.
16. Ku CS, Loy EY, Pawitan Y, Chia KS. *The pursuit of genome-wide association studies: where are we now?* J Hum Genet 2010; 55(4):195-206.
17. Merks JHM, Karnembeek CDM *et al. Phenotypic abnormalities: terminology and classification.* Am J Med Genet 2003; 123A:211-230.
18. Ng SB, Nickerson DA, Bamshad MJ, Shendure J. *Massively parallel sequencing and rare disease.* Hum Mol Genet 2010; 19(R2):R119-124.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

19. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J. *Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis.* N Engl J Med 1993; 329:1982-1987.
20. Pyeritz RE. *Family history and genetic risk factors. Forward to the future.* JAMA 1997; 278:1284-1285.
21. Shalev SA, Hall JG. *Behavioural pattern profile.* Am J Med Genet 2004; 128A:389-395.
22. Slaney SF, Wilkie AOM, Hirst MC, Charlton R, McKinley M, Pointon J, Christodoulou Z, Huson SM, Davies KE. *DNA testing for fragile X syndrome in schools for learning difficulties.* Arch Dis Child 1995; 72: 33-37.
23. Strømme P. *The diagnostic of syndromes by use of a dysmorphology database.* Acta Paediatr Scand 1991; 80: 106-109.
24. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. *An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms.* Nucleic Acids Res 2001; 29:E88-89.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 11

BOLILE CROMOZOMIALE

Anomaliile cromozomiale constituționale pot avea efecte fenotipice diferite în funcție de tipul modificării (vezi capitolul 7.C).

- Anomaliile cromozomiale numerice sau structurale *neechilibrate* determină, obligatoriu, un fenotip anormal care cel mai frecvent este letal, produsul de concepție fiind eliminat prin avort spontan sau prin deces antenatal. Trisomiile sau monosomiile (complete sau parțiale), compatibile cu dezvoltarea embrio-fetală produc modificări fenotipice caracteristice anomaliei, generând sindroame cromozomiale particulare, cu o incidență globală de 1/250 de nou-născuți vii.
- Anomaliile structurale *echilibrate* nu modifică, de regulă, fenotipul purtătorului, dar pot genera tulburări de reproducere, fie prin blocarea gametogenezei, fie prin producerea unor gameți anormali.

Numeroase studii epidemiologice au demonstrat că anomaliile cromozomiale reprezintă o cauză majoră de morbiditate și mortalitate, în special în copilărie, în timp ce la adult se asociază cu tulburări de reproducere. Bolile cromozomiale sunt boli sistemice, prezența unei patologii cromozomiale fiind sugerată de tulburările de creștere pre- și postnatală, retardul psihomotor, un sindrom plurimalformativ mai mult sau mai puțin specific fiecărei anomalii neechilibrate și tulburările de reproducere. În acest context medicii de orice specialitate trebuie să cunoască reperele fenotipice majore, precum și situațiile concrete în care ar trebui să recomande o analiză cromozomială prenatală sau postnatală (vezi capitolul 10.B.1). În tabelul 11.1 sunt prezentate cele mai frecvente boli cromozomiale, incidența lor globală și tipul de anomalie cromozomială asociată.

În cazul bolilor cromozomiale, prezentate succint în acest capitol, pot fi identificate mai multe trăsături generale:

- Anomaliile fenotipice caracteristice fiecărei afecțiuni sunt determinate de *anomalii de dozaj ale unor gene* situate pe cromozomii/segmentele cromozomiale implicate. În cazul unor anomalii cromozomiale, în special în cel al sindroamelor cu microdelеții/microduplicații cromozomiale, au fost identificate gene specifice ale căror anomalii de dozaj determină un efect fenotipic major și care explică trăsăturile fenotipice caracteristice. Caracterizarea precisă a anomaliilor cromozomiale și a fenotipurilor asociate, precum și identificarea funcției genelor, vor permite dobândirea de noi cunoștințe care vor schimba, cu siguranță, modul de abordare a acestor afecțiuni.
- Dezechilibrul genetic, indiferent de tip, determină o serie de *„semne comune"* (Opitz, 1981): tulburări de creștere prenatală și postnatală, dismorfie facială și, frecvent, anomalii congenitale majore multiple, displazii în diverse țesuturi, dermatoglife anormale, alterări ale structurii și funcției SNC (retard mental), tulburări ale funcției gonadale.
- Gravitatea afectării fenotipice depinde de mai mulți factori (vezi și capitolul 7.C.2):
  - mărimea dezechilibrului genetic (anomaliile complete sunt mai grave decât cele parțiale);
  - tipul de anomalie cromozomială (anomaliile autozomale sunt mai grave decât cele gonozomale);
  - conținutul genic al cromozomului implicat (anomaliile zonelor bogate în eucromatină sunt mai grave decât cele ale regiunilor de heterocromatină);
  - numărul celulelor afectate (anomaliile omogene sunt mai severe decât cele în mozaic).
- Deși bolile cromozomiale sunt incurabile, iar posibilitățile de profilaxie sunt limitate, unele acțiuni medicale sau medico-sociale permit depistarea prenatală precoce și pot ameliora atât îngrijirea bolnavilor, cât și integrarea lor socială.

BCU "VICTOR BABEȘ" UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 11.1. Principalele boli cromozomiale (în ordinea incidenței)

Boală	Incidență la nou-născuții vii	Tip de anomalie
Sindromul Down	1/650-1/800	Trisomie completă sau parțială 21
Sindromul Klinefelter	1/500-1/700 1/17.000-1/50.000 B 1/17.000-1/50.000 B 1/85.000-1/100.000 B	Trisomie completă XXY Tetrasomie XXYY Tetrasomie XXXY Pentasomie XXXXY
Sindromul triplu X	1/1.000 F	Trisomie completă X
Trisomia XYY	1/1.000 B	Trisomie completă XYY
Azoospermia	1/2.000-1/3.000 B	Nulisomie Yq11
Sindromul Turner	1/2.500-1/5.000 F	Monosomie completă sau parțială X
Sindromul velo-cardio-facial	1/2.000-1/6.400	Monosomie parțială 22q11.2
Sindromul de deleție 16p11.2	1/3.300	Monosomie parțială 16p11.2
Sindromul de deleție 1p36	1/5.000-1/10.000	Monosomie parțială 1p36
Sindromul Edwards	1/5.000-1/8.000	Trisomie completă sau parțială 18
Sindromul Williams-Beuren	1/7.500	Monosomie parțială 7q11.2
Sindromul Patau	1/10.000-1/20.000	Trisomie completă sau parțială 13
Sindrom Prader-Willi	1/10.000-1/30.000	Deleție paternă 15q11.2-q13 (70% din cazuri) Disomie uniparentală maternă 15q11.2-q13 (25% din cazuri)
Sindrom Angelman	1/12.000-1/20.000	Deleție maternă 15q11.2-q13 Disomie uniparentală paternă 15q11.2-q13
Sindrom Beckwith-Wiedeman	1/13.700	Disomie uniparentală paternă 11p15 (10-20% din cazuri) Trisomie parțială 11p15 de origine paternă (1-2% din cazuri)
Sindromul Smith-Magenis	1/15.000-1/25.000	Monosomie parțială 17p11.2 (90% din cazuri)
Sindromul de deleție 17q21.31	1/16.000	Monosomie parțială 17q21.31
Bărbații 46,XX	1/20.000	Translocație germinală (Yp;Xp) la tată
Sindromul de duplicație 22q11.2	1/23.000	Trisomie parțială 22q11.2
Sindromul Wolf-Hirschhorn	1/50.000	Monosomie parțială 4p16
Sindromul *cri-du-chat*	1/50.000	Monosomie parțială 5p15
Sindrom Alagille	1/70.000	Monosomie parțială 20p12
Sindrom Russell-Silver	1/100.000	Disomie uniparentală maternă 7 (5-10% din cazuri)
Sindrom Rubinstein-Taybi	1/125.000	Monosomie parțială 16p13.3 (10% din cazuri)
Sindromul de deleție 2q37	< 1/100.000	Monosomie parțială 2q37

A. Boli cromozomiale autozomale

Bolile cromozomiale produse prin anomalii neechilibrate ale autozomilor constituie un grup de peste 100 de entități, dar numai trei anomalii *complete și omogene* sunt compatibile cu supraviețuirea: trisomia 21 (sindromul Down), trisomia 18 (sindromul Edwards) și trisomia 13 (sindromul Patau). Alte trisomii autozomale sunt rare și au fost depistate doar forme în mozaic. Anomaliile structurale neechilibrate produc *trisomii și monosomii parțiale*, cea mai frecventă fiind microdeleția 22q11.2 ce determină sindromul velo-cardio-facial.

1. Sindroame produse de trisomii autozomale

1.1. Sindromul Down

Sindromul Down, produs de trisomia 21, reprezintă prima cauză de retard mental și este cea mai frecventă și mai cunoscută boală cromozomială. Maladia a fost descrisă clinic de John Langdon Down în 1866, dar abia în 1959, Jérome Lejeune și colaboratorii săi au stabilit că afecțiunea este produsă de trisomia 21.

Incidența trisomiei 21 a fost estimată la 1:650--1:800 nou-născuți vii (prevalența globală este de 1,42

la 1.000. Frecvența anomaliei la produșii de concepție este mult mai mare (1/200), dar 3/4 sunt eliminați ca avorturi spontane. Boala este mai frecventă la copiii de sex masculin, raportul sexelor fiind de 3 băieți la 2 fete.

Simptomatologia clinică diferă în funcție de vârsta la care este examinat pacientul. De obicei, sindromul Down este diagnosticat clinic în perioada neonatală sau la sugar datorită asocierii hipotonie – dismorfie facială caracteristică. Dismorfia este evocatoare și, cu toate că variază la diferiți pacienți, realizează un aspect fenotipic caracteristic[1] („*...dacă ai văzut un copil cu sindromul Down i-ai văzut pe toți.*").

Nou-născutul cu trisomie 21 are talia și greutatea mai mici decât parametrii vârstei gestaționale, prezintă hipotonie musculară, hiperextensibilitate și reflexe comportamentale reduse (de exemplu, reflexul Moro) (tabelul 11.2). Capul este brahicefalic, cu occiput turtit și fontanele largi. Fața este rotundă, plată și prezintă o dismorfie sugestivă: epicantus (un repliu cutanat în unghiul intern al ochiului), fantele palpebrale oblice în sus și în afară[2]; nasul mic cu rădăcina turtită și narine mici, anteversate; gura deschisă cu protruzie linguală (datorită microstomiei); urechile mai jos situate, mici și displazice. Gâtul este scurt, cu exces de piele pe ceafă. Mâinile sunt scurte și late, cu brahidactilie, clinodactilia (încurbarea) degetului V și, frecvent, un singur pliu palmar transvers (*pliu simian*). Inconstant sunt prezente unele malformații viscerale (defecte cardiace, atrezie duodenală, imperforație anală).

Tabelul 11.2. Semnele cardinale pentru diagnosticul de sindrom Down în perioada neonatală și de sugar
(adaptat după Hall, 1966)

Semne	*Frecvență (%)*
Hipotonie musculară	100
Profil facial plat	90
Reflex Moro redus	85
Fante palpebrale oblice în sus și în afară	80
Exces de piele pe ceafă	80
Hiperlaxitate articulară	80
Pelvis displazic	70
Urechi mici, rotunde, jos situate	60
Clinodactilie	60
Pliu simian	45
Prezența a 6 din cele 10 semne pledează pentru diagnosticul de sindrom Down	

La *sugar* și *copilul mic*, pe lângă elementele clinice descrise mai sus, apar și alte particularități. Talia și greutatea se află sub media vârstei, hipotonia musculară persistă și se asociază cu hiperlaxitate articulară și hiporeflexie. Devin mai evidente unele elemente dismorfice cranio-faciale: microcefalia cu occiput turtit, fantele palpebrale oblice în sus și în afară (mai ales când sugarul plânge), irisul pestriț (cu pete Brushfield, de culoare maronie), hipoplazia etajului mijlociu al feței (față plată), limbă protruzionată (și mai târziu plicaturată) (figura 11.1). La nivelul membrelor, brahidactilia și clinodactilia auricularului sunt mai pronunțate, iar prin amprentare sau folosirea unei lupe sunt evidențiate dermatoglifele anormale (pliu palmar transvers unic, exces de bucle cubitale, triradius axial situat distal ș.a.). Spațiul interdigital I la picior este mult mai larg. Luate separat *nici unul din semnele prezentate mai sus nu este patognomonic, dar asocierea lor susține diagnosticul clinic de sindrom Down.* Deși, în majoritatea cazurilor, examenul clinic permite stabilirea diagnosticului de sindrom Down, efectuarea cariotipului este obligatorie, fiind necesară pentru stabilirea tipului citogenetic de trisomie 21, element esențial în acordarea unui sfat genetic corect.

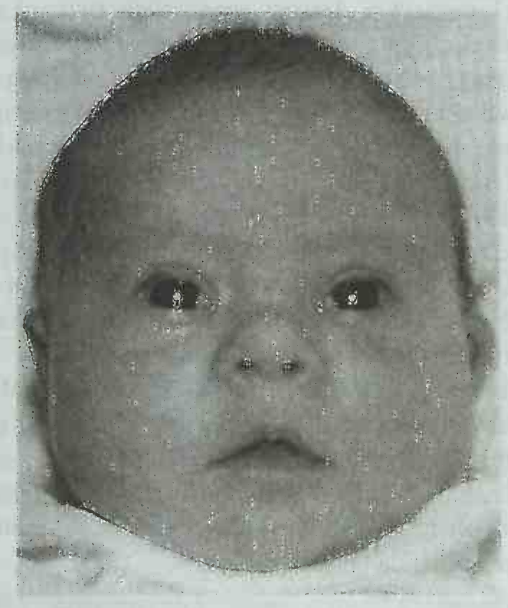


Figura 11.1. Aspectul facial caracteristic al unui sugar cu sindrom Down
(Colecția Centrului de genetică medicală Iași)

Unii pacienți cu sindrom Down pot prezenta *diferite malformații viscerale:* cardio-vasculare, digestive și renale[3]. Malformațiile cardiace afectează

1. Diagnosticul este mai dificil la prematuri.
2. Aceste caracteristici au dus la denumirea improprie și prohibită de *mongolism.*
3. Unele anomalii congenitale nu pot fi depistate în perioada neonatală, devenind evidente în timpul copilăriei sau chiar mai târziu

aproximativ 20-40% dintre nou-născuții cu sindrom Down, majoritatea fiind defecte septale (atrio-ventriculare, ventriculare sau atriale). Malformațiile digestive, reprezentate în special de atrezii/stenoze duodenale și megacolon, pot fi întâlnite la 3-5% din cazurile de sindrom Down.

În al doilea an de viață devine evidentă întârzierea de dezvoltare psihomotorie: toate achizițiile copilăriei se fac cu 2-3 ani mai târziu decât la copilul normal. Mersul este mult timp nesigur, iar vorbirea relativ simplă. Copiii sunt însă liniștiți, ascultători, au o personalitate atrăgătoare, iubesc anturajul, muzica, veselia. În sindromul Down există *întotdeauna un retard mental* care variază de la sever la moderat (coeficientul de inteligență al persoanelor afectate variază între 20 și 85) și este asociat cu tulburări de limbaj. Un bolnav cu sindrom Down poate acumula un nivel maxim de cunoștințe comparabil cu cel al unui copil normal cu vârsta între 6 și 8 ani și *nu este capabil de o viață independentă*[4].

În sindromul Down ritmul de creștere este redus iar talia, indiferent de vârsta de examinare, va fi cu ≥2 DS sub media normală a vârstei (talia finală maximă va fi de 140-160 cm). La adolescenți și adulți, deseori este prezentă obezitatea, iar dezvoltarea pubertară este întârziată și, deseori, incompletă. Bărbații sunt sterili, în timp ce femeile au o fertilitate redusă[5].

Diagnosticul clinic diferențial al sindromului Down este rareori necesar. Macroglosia și microstomia din sindromul Down trebuie diferențiate de cele din hipotiroidia congenitală sau din sindromul Beckwith-Wiedemann; unele elemente ale dismorfiei cranio-faciale se întâlnesc și în sindroamele Smith-Magenis, Zellweger sau triplo-X (vezi OMIM sau Orphanet). Diagnosticul de sindrom Down este certificat prin efectuarea cariotipului.

Analiza citogenetică este esențială pentru diagnostic și *obligatorie în fiecare caz*, chiar dacă examenul clinic este relevant, deoarece în funcție de rezultatul analizei cromozomiale se calculează riscul de recurență și se acordă sfatul genetic. Cariotipul poate evidenția (figura 11.2):

- *trisomie 21 liberă* și *omogenă*, ce reprezintă 92-95% dintre cazurile de sindrom Down; se produce prin nedisjuncție meiotică, cel mai frecvent (85-90%) maternă și în special în meioza I (75%)[6];
- *trisomie 21 liberă în mozaic* (de tip 47/46), în circa 2-3% dintre cazuri, rezultă prin nedisjuncție mitotică postzigotică sau, foarte rar, prin pierderea unui cromozom 21 în celulele ce derivă dintr-un zigot trisomic („*salvarea*" unei trisomii omogene);
- *trisomie 21 prin translocație Robertsoniană* între cromozomul 21 și un alt cromozom acrocentric

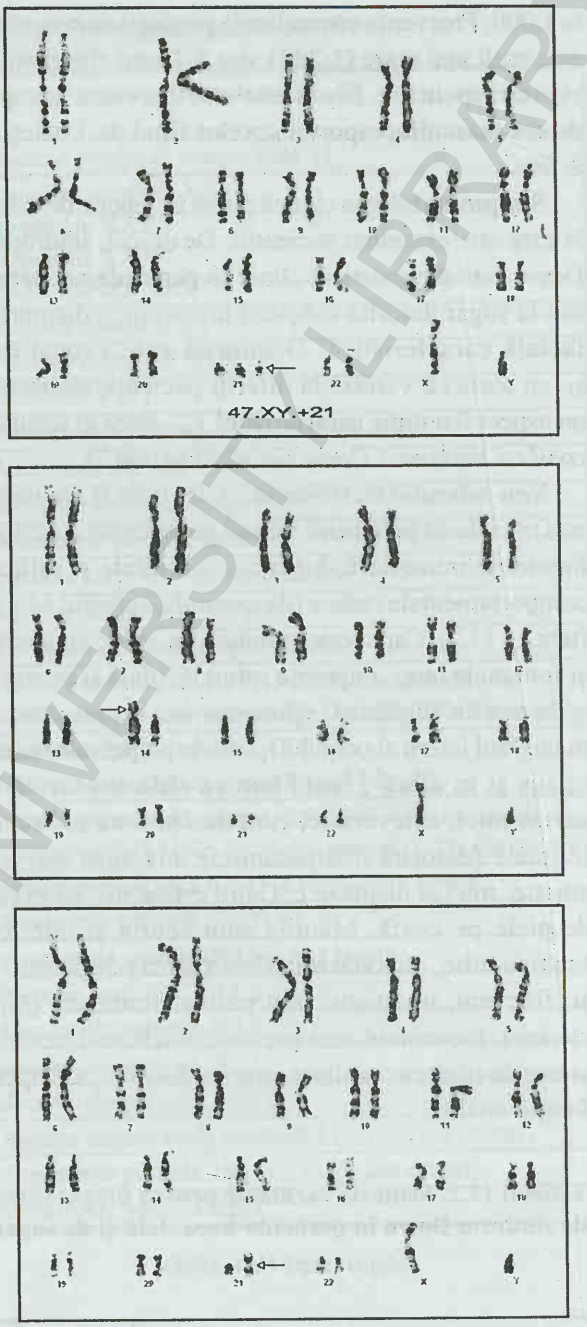


Figura 11.2. Cariotipuri în sindromul Down: a). trisomie 21 liberă; b) trisomie 21 prin translocație rob(14;21); trisomie 21 prin translocație rob(21;21)
(Colecția Centrului de genetică medicală Iași)

4. În țările dezvoltate există o serie de proiecte sociale care au permis integrarea mai mult sau mai puțin completă în societate și un anumit grad de independență.
5. Reproducerea este însă numai accidentală, ținând cont de handicapul intelectual, iar femeile cu sindrom Down prin trisomie 21 omogenă pot avea copii normali sau cu trisomie 21.
6. Originea maternă sau paternă a nedisjuncției meiotice și tipul ei – nedisjuncție în meioza I sau meioza II – au fost stabilite prin tehnici moleculare.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

poate fi observată în 4-5% dintre cazuri şi frecvent rezultă din dezechilibrarea meiotică a unei translocaţii Robertsoniene echilibrate prezente la unul din părinţi. Translocaţia rob(14;21) este cea mai frecventă, în jumătate din cazuri fiind moştenită de la unul dintre părinţi, cel mai adesea de la mamă, fără nici o legătură cu vârsta maternă. Translocaţiile rob(21;22) sau rob(21;21) sunt mult mai rare şi majoritatea sunt *de novo*;

- *trisomie 21 parţială*, în mai puţin de 1% dintre cazuri, rezultă prin duplicaţia parţială a braţului lung al cromozomului 21 sau prin segregarea meiotică a cromozomilor derivativi, formaţi în urma unor translocaţii reciproce echilibrate implicând cromozomul 21, prezente la unul dintre părinţi.

Evoluţie şi prognostic. Încă din primii ani de viaţă pacienţii cu sindrom Down sunt confruntaţi cu variate probleme medicale. Cele mai importante sunt determinate de malformaţiile viscerale, în special cardiace şi digestive. Infecţiile respiratorii sunt frecvente (printr-o imunodeficienţă nespecifică), iar riscul de a dezvolta leucemie acută, secundară unui sindrom mieloproliferativ tranzitoriu, este de 15-20 ori mai mare decât în populaţia generală. Din aceste motive, mortalitatea în primii 5 ani de viaţă era mare şi în 1960 numai jumătate dintre copii cu sindrom Down supravieţuiau până la această vârstă. În ultimii 30 de ani, în ţările dezvoltate, rata de supravieţuire s-a îmbunătăţit semnificativ (prin tratamentul chirurgical al cardiopatiilor congenitale, antibioterapie, reducerea instituţionalizării şi integrare socială), iar speranţa de viaţă este acum de circa 55-60 de ani. Între 5 şi 39 de ani mortalitatea în sindromul Down este aproximativ asemănătoare cu cea din populaţia generală; totuşi, morbiditatea este mai crescută: 10-15% dintre pacienţii cu sindrom Down prezintă epilepsie, tulburări vizuale (cataractă, glaucom, strabism), surditate, hipotiroidie, instabilitate atlanto-axială. După 40 de ani se instalează frecvent o demenţă senilă precoce, astfel încât la vârsta de 60 de ani 50-70% dintre pacienţii cu sindrom Down prezintă boală Alzheimer. În plus, după vârsta de 40 de ani creşte semnificativ şi mortalitatea prin accidente vasculare. În ţările dezvoltate, rata de supravieţuire la 50 de ani este de 85%, iar la 60 de ani este de numai 44%, adică jumătate din cea a populaţiei generale.

Etiologie şi patogenie. Patogenia sindromului Down a fost descifrată pe baza analizei moleculare a rarelor cazuri de trisomie parţială şi prin studiul modelelor animale (în special murine) la care a fost indusă o trisomie echivalentă celei din sindromul Down. Principalele elemente specifice bolii sunt determinate, prin efect de dozaj, de genele din regiunea 21q22.1-22.3 (numită *Down Syndrome Critical Region* sau DSCR) aflate în triplu exemplar la pacienţii cu sindrom Down.

> La nivelul regiunii DSCR au fost cartografiate următoarele gene: *APP* – gena pentru proteina precursor a amiloidului beta, *S100B* – gena pentru o proteină de legare a calciului (corelate cu neuropatia de tip Alzheimer la pacienţii cu sindrom Down), *SOD1* – gena pentru superoxid dismutaza 1, *ETS2* – oncogenă (implicată în riscul crescut de leucemie la bolnavii cu sindrom Down), *CBS* – gena pentru cistationin-beta-sintetază (implicată în metabolismul folaţilor) şi *CRYA1* – gena pentru proteina alfa a cristalinului (corelată cu frecvenţa crescută a cataractei). Câteva gene candidat pentru retardul mental în sindromul Down sunt: *DYRK1A*, ce codifică o protein-kinază (implicată în controlul proliferării neuroblaştilor), *SIM2* (necesară pentru sincronizarea diviziunilor celulare în cursul dezvoltării cerebrale), *GART* ce codifică o fosforibozil gliacinamid-formil-transferază (implicată în dezvoltarea prenatală a cerebelului), *PCP4* – proteina tip 4 a celulelor Purkinje (rol în dezvoltarea cerebelului), *DSCAM – Down syndrome cell adhesion molecule* (considerată a fi implicată în creşterea axonală, şi, probabil, în defectele congenitale cardiace) şi *GRIK1* – receptor pentru glutamat (implicat în funcţia celulelor piramidale ale cortexului). Cu toate progresele realizate, patogenia sindromului Down are încă multe enigme.

Problema esenţială este însă elucidarea etiologiei acestei trisomii frecvente. Vârsta maternă este singurul determinant evident al nedisjuncţiei (vezi capitolele 6.C.1 şi 7.C), dar numai circa 25% dintre pacienţii cu sindrom Down se nasc din femei care au peste 35 de ani. Şi totuşi, faptul că 85-90% din cazuri rezultă prin nedisjuncţie maternă (3/4 în meioza I) sugerează intervenţia unui factor de risc ce acţionează la acest nivel. S-au emis diferite ipoteze, dar nici una nu a fost validată de probe convingătoare (în subcapitolul 7.C.3 sunt discutate efectele vârstei materne asupra nedisjuncţiei).

Sfat genetic. În condiţiile în care sindromul Down are o incidenţă mare, o gravitate crescută şi este lipsit de terapii adecvate, determinarea *riscului naşterii unui copil afectat* şi acordarea unui sfat genetic corect reprezintă o problemă frecventă în practica medicală curentă. Riscul de trisomie 21 depinde în principal de vârsta mamei[7] (în trisomia 21 liberă şi omogenă) (tabelul 11.3) şi de existenţa unei anomalii cromozomiale echilibrate la unul din părinţi (în trisomie 21 prin translocaţie Robertsoniană).

7. Vârsta paternă nu are o influenţă semnificativă asupra riscului naşterii unui copil cu sindrom Down.

Tabelul 11.3. Corelația între vârsta maternă în momentul concepției și riscul de sindrom Down la descendenți

(adaptat după Hecht și Hook, 1994)

Vârsta maternă (ani)	Prevalența sindromului Down la naștere	
	‰	1/nn
20	0,65	1.560
30	1,12	890
35	2,81	375
36	3,57	280
37	4,59	220
38	5,98	170
39	7,84	130
40	10,4	97
41	13,8	73
42	18,3	55
43	24,5	41
44	32,8	30
45	44,1	25

O primă situația în care o familie poate solicita sfat genetic este aceea în care *nu există antecedente familiale de sindrom Down*. În acest caz riscul de a avea un copil cu sindrom Down depinde de *vârsta mamei*, fiind, spre exemplu, de 1/1.560 la 20 ani, de 1/375 la 35 de ani și de 1/25 la 45 ani (tabelul 11.3). Ținând cont că la 35 de ani riscul de a avea un copil cu trisomie 21 este dublu față de riscul populației generale (respectiv 1/350 față de 1/700) și că acest risc este mai mare decât riscurile cumulate ale procedurilor invazive[8] folosite pentru diagnosticul prenatal (biopsia de vilozități coriale și amniocenteza), *vârsta de 35 de ani și riscul asociat de 1/350 au fost alese, în multe țări, ca limite în depistarea și diagnosticul prenatal*.

O a doua situație este cea în care cuplul *consultant are o rudă cu sindrom Down* la care nu a fost efectuat (nu se cunoaște) cariotipul[9]. În condițiile în care cea mai frecventă anomalie cromozomială asociată sindromului Down este trisomia 21 liberă și omogenă, se poate presupune că ruda afectată a avut o astfel de anomalie, riscul în acest caz fiind practic similar cu cel al femeilor de vârstă identică din populația generală. Excluderea unei anomalii cromozomiale echilibrate cu transmitere familială, situație mai rară, dar în care riscul de recurență al trisomiei 21 este semnificativ mai mare, se realizează prin efectuarea cariotipurilor parentale.

Cea mai frecventă situație întâlnită în practica medicală este cea în care cuplul consultant, ce are deja un copil cu trisomie 21, solicită determinarea ***riscului de recurență*** al sindromului Down pentru o nouă sarcină. În acest caz riscul este dependent de tipul de trisomie 21.

- În *trisomia 21 liberă și omogenă*, riscul teoretic de recurență este în medie de 1%. Deși riscurile de recurență sunt mici[10], se recomandă efectuarea analizei cromozomiale prenatale la toate gravidele care au avut deja un copil cu sindrom Down prin trisomie 21 liberă și omogenă (pentru a exclude un mozaic germinal).
- Riscul de recurență este nesemnificativ (< 0,1%) în *trisomiile 21 prin mozaic*, deoarece anomalia este determinată de un accident mitotic în primele etape ale dezvoltării embrionare.
- În cazul unui copil cu *trisomie 21 prin translocație neechilibrată* se impune obligatoriu efectuarea analizei cromozomiale la ambii părinți.
  - Dacă translocația este *de novo*, părinții având cariotip normal, riscul de recurență a bolii este mic, de 1%.
  - În cazul în care translocația este *prezentă la tată*, riscul de recurență este mic, de circa 3-5%, deoarece prezența anomaliei cromozomiale induce o blocare a meiozei în spermatocitele care au dezechilibru cromozomial.
  - Dacă translocația este *prezentă la mamă*, riscul de recurență depinde de tipul anomaliei: în translocațiile Robertsoniene între cromozomi acrocentrici neomologi, riscul de naștere al unui nou copil cu sindrom Down este de 10-15 %; în schimb, în cazul prezenței unei translocații Robertsoniene t(21;21) riscul de recurență este de 100%.

Depistarea prenatală a trisomiei 21, ca și a altor aneuploidii fetale, cuprinde tehnicile propuse[11] *tuturor gravidelor*, indiferent de vârstă, în scopul depistării sarcinilor cu un risc crescut de aneuploidie fetală (vezi capitolul 19.B. Depistarea prenatală permite calcularea riscului de aneuploidie fetală pentru sarcina în curs. Dacă acest risc este mai mare decât o valoare prag atunci sarcina este considerată cu *risc crescut de aneuploidie fetală* și se practică *diagnosticul prenatal* în scopul confirmării diagnosticului. Dacă

8. Principalele incidente asociate recoltării de celule fetale sunt avortul spontan, hemoragia, afectarea unei regiuni anatomice fetale și infecția.
9. De cele mai multe ori ruda cu sindrom Down a decedat înainte de recoltarea de celule pentru analiza cromozomială.
10. Pentru femeile sub 30 de ani este puțin mai mare, de circa 1,4% (probabil datorită unor mozaicuri germinale nedepistate) în timp ce pentru femeile de peste 30 de ani riscul este același cu cel determinat de vârsta maternă.
11. Participarea gravidelor la programele de depistare prenatală și/sau diagnostic prenatal este *voluntară*, ele fiind prealabil informate de modalitățile tehnice de realizare, de scopul și limitele lor, și *nu este condiționată de întreruperea sarcinii* în cazul identificării unei anomalii cromozomiale.

riscul calculat este mai mic decât valoarea prag sarcina este considerată fără risc şi nu necesită o supraveghere particulară.

Deoarece riscul de aneuploidie este determinat pe baza unei analize statistice în care valoarea prag joacă un rol important, trebuiesc subliniate două elemente:
- nu toate sarcinile identificate ca fiind sarcini cu risc vor fi afectate de o aneuploidie fetală (sarcini *fals pozitive*, cu cariotip normal, pentru care recurgerea la puncţia amniotică în scop diagnostic determină un risc non-neglijabil de pierdere a sarcinii);
- nu toate sarcinile identificate ca fiind fără risc corespund unui cariotip normal (aceste sarcini *fals negative*, deşi au un risc calculat mai mic decât valoarea prag, corespund unui fetus cu aneuploidie).

Strategiile de depistare prenatală folosesc metode biochimice, examen ecografic sau asocierea acestor doua tipuri de metode. *Metodele biochimice* de depistare prenatală sunt bazate pe dozarea unor *markeri serici în sângele matern* în primul trimestru (săptămânile de sarcină 11-14) sau al doilea trimestru de sarcină (săptămânile de sarcină 14-18).

- În *primul trimestru de sarcină* sunt dozaţi doi markeri serici (test dublu), proteina plasmatică A asociată sarcinii – PAPP-A (*Pregnancy Associated Plasmatic Protein-A*) – şi fracţia liberă a gonadotrofinei corionice umane (β-hCG). Testul este sugestiv pentru sindromul Down când scădere PAPP-A şi creşte β-hCG.
- În cel de-*al doilea trimestru al sarcinii* pot fi dozaţi trei markeri (test triplu) – a-fetoproteina (AFP), estriolul neconjugat (uE3) şi b-hCG totală sau numai fracţia sa liberă – sau patru markeri – *Inhibina A* putându-se asocia celor trei markeri deja enumeraţi (test cvadruplu). Testul este sugestiv pentru sindromul Down când sunt depistate: un nivel scăzut al AFP şi uE3, un nivel crescut al β-hCG.

Valorile acestor parametri biochimici sunt exprimate ca un multiplu al medianei valorilor corespunzătoare femeilor cu aceeaşi vârstă a sarcinii (MoM – *multiple of the median*). Compararea acestor valori cu valorile normale şi patologice identificate prin studii prospective permite calcularea riscului relativ de aneuploidie fetală pentru sarcina în curs[12].

*Depistarea (*screening*) prenatală prin examen ecografic* poate fi realizată în primul sau al doilea trimestru al sarcinii. În *primul trimestru de sarcină* parametrul măsurat este grosimea spaţiului subcutanat la nivelul cefei fetusului (*translucenţa nucală*), între pielea cefei şi regiunea cervicală a coloanei vertebrale. O valoare ce depăşeşte fie 3 mm, fie percentilul 95 corespunzătoare vârstei sarcinii indică un risc crescut de trisomie 21. Ca şi în cazul metodelor biochimice, compararea valorilor măsurate ecografic cu valorile normale şi patologice permite calcularea unui risc relativ de trisomie 21. Examenul ecografic realizat în cel de-*al doilea trimestru* poate evidenţia creşterea translucenţei nucale, prezenţa chisturilor plexurilor coroide, scurtarea oaselor lungi (femur, humerus) sau prezenţa de anomalii cardiace şi/sau digestive. Valoarea predictivă a acestor elemente nu este încă bine stabilită.

Diagnosticul prenatal al trisomiei 21 este constituit de totalitatea metodelor diagnostice utilizate pentru confirmarea diagnosticului de trisomie 21 la sarcinile considerate ca având un risc crescut de aneuploidie în comparaţie cu populaţia generală (vezi capitolul 19.C. În categoria sarcinilor cu risc sunt incluse:

- sarcinile identificate prin depistarea prenatală;
- sarcinile ce prezintă o asociere de elemente ecografice sugestive pentru trisomia 21;
- sarcinile femeilor în vârstă de peste 38 de ani, dacă nu au beneficiat de depistarea prenatală;
- sarcinile cu risc crescut datorită existenţei unei anomalii cromozomiale echilibrate la unul din membrii cuplului (translocaţie robertsoniană, spre exemplu).

Examenul citogenetic al celulelor fetale poate fi realizat în primul trimestru al sarcinii, pe celule fetale obţinute prin *puncţia de vilozităţi coriale* (cariotip direct şi după cultură pentru a elimina discordanţele feto-placentare) sau în cel de-al doilea trimestru prin *puncţia de lichid amniotic* (cariotip după cultura amniocitelor). Tehnicile rapide de citogenetică moleculară (FISH, QF-PCR sau MLPA) pot fi, de asemenea, utilizate, ele având avantajul că nu necesită o etapă de cultură a celulelor.

Îngrijirea copiilor cu sindrom Down ridică numeroase probleme care sunt bine standardizate şi implică diverşi specialişti. Vom sublinia doar faptul că este necesară o susţinere psihologică continuă şi un sprijin adecvat al părinţilor pentru a face faţă problemelor ridicate de creşterea unui astfel de copil. De asemenea, nu trebuie ignorate problemele etice ale sfatului genetic şi ale diagnosticului prenatal în aceste cazuri (vezi capitolul 21).

12. Alţi factori ce trebuie luaţi în considerare în estimarea riscului de trisomie 21 sunt greutatea gravidei, tabagismul şi prezenţa eventuală a diabetului sau a unei sarcini gemelare. Toate aceste elemente sunt luate în considerare când sunt aplicate programe computerizate care permit calcularea exactă a riscului.

ROMANIAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.2. *Sindromul Edwars*

Incidență. Sindromul Edwards, determinat de trisomia 18, are o incidență de aproximativ 1/5.000-8.000 de naşteri, majoritatea cazurilor (80%) fiind de sex feminin[13]. Incidența la concepție este mult mai mare, dar aproximativ 95% dintre embrionii cu trisomie 18 sunt eliminați prin avort spontan.

Simptomatologie. *Nou-născutul* prezintă o greutate mică pentru vârsta gestațională, hipertonie (!) şi o dismorfie cranio-facială evocatoare: cap alungit (dolicocefalie) cu occiput proeminent, frunte teşită, microftalmie şi fante palpebrale scurte, microretrognatism, urechi jos implantate şi hipoplazice („*urechi de faun*") (figura 11.3). Degetele mâinii sunt flectate şi încălecate într-un mod caracteristic: degetele 2 şi 5 acoperă degetele 3 şi 4. Unghiile sunt hipoplazice, iar dermatoglifele sunt anormale (exces de arcuri, pliu simian). Sternul este scurt, iar piciorul are aspect de „piolet" (datorită proeminenței posterioare a calcaneului) şi prezintă un haluce scurt. Majoritatea pacienților au diverse tipuri de hernii sau omfalocel. Frecvent sunt prezente malformații congenitale grave: cardiace – de obicei defecte septale ventriculare asociate cu defecte valvulare aortice şi pulmonare (90% dintre cazuri) – renale, cerebrale, vertebrale. Suspiciunea clinică este susținută şi de evidențierea anamnestică a polihidramniosului în cursul sarcinii (la circa 60% din cazuri).

Diagnosticul clinic diferențial vizează *secvența de akinezie fetală (sindromul Pena-Shokeir tip I)* şi *artrogripoza distală tip 1*. Ambele prezintă contracturi articulare multiple, inclusiv încălecări ale degetelor, dar lipsesc malformațiile cardiace şi dismorfia facială caracteristică trisomiei 18. De asemenea, malformații viscerale asemănătoare pot fi întâlnite în asociația CHARGE (vezi capitolul 15).

Analiza citogenetică stabileşte diagnosticul prin evidențierea unei trisomii 18 complete şi omogene (94%), a unei trisomii în mozaic (5%) sau a unei trisomii 18 parțiale (1%).

Evoluție şi prognostic. Speranța de viață este foarte mică, aproximativ 90% dintre copii murind în primele 6 luni de viață din cauza malformațiilor viscerale grave, infecțiilor şi deficitelor funcționale ale SNC[14]. Doar 5% supraviețuiesc după vârsta de 1 an, dar prezintă întotdeauna o întârziere severă în dezvoltarea psihomotorie.

Etiologie şi patogenie. Sindromul Edwards este produs de trisomia 18. În trisomiile complete cromozomul suplimentar rezultă în 95% din cazuri – prin nedisjuncție maternă. Spre deosebire de trisomia 21, peste 50% dintre erorile de distribuție se produc însă în meioza II. Nu a fost identificată o regiune critică pe cromozomul 18 asociată fenotipului de sindrom Edwards, dar, foarte probabil, aceasta este localizată 18q.

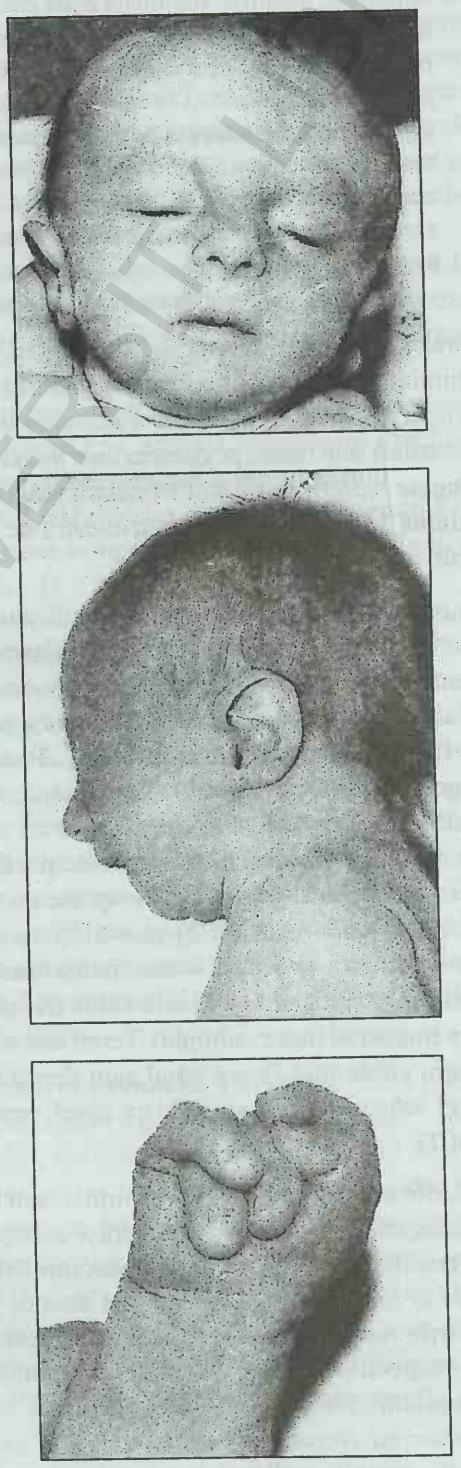


Figura 11.3. Nou-născut cu trisomie 18
(Colecția Centrului de genetică medicală Iaşi)

13. Se pare că există o selecție negativă prenatală împotriva fetilor de sex masculin cu trisomie 18.
14. Probabilitatea de supraviețuire la 1 lună este de 38,6%, iar la 1 an de 8,4%.

BCU IAŞI - CAROL I UNIVERSITY LIBRARY

Sfat genetic. Se estimează că riscul de recurență după nașterea unui copil cu trisomie 18 liberă și omogenă este de 1-2%. În trisomiile parțiale riscul depinde de prezența sau absența unei anomalii cromozomiale echilibrate la unul dintre părinți. La 60% dintre embrionii cu trisomie 18, depistarea prenatală este pozitivă, cu semnele de alarmă ecografice – întârzierea în creșterea intrauterină, prezența de chisturi ale plexurilor coroide, mărirea cisternei magna, prezența unei malformații majore – sau a unei alterări biochimice – valori scăzute ale AFP, hCG și uE3. Confirmarea diagnosticului se face numai prin efectuarea analizei citogenetice a celulelor fetale prin tehnici convenționale (cariotip) sau moleculare (FISH, QF-PCR).

1.3. Sindromul Patau

Incidență. Sindromul Patau, determinat de trisomia 13, are o incidență de aproximativ 1/10.000-20.000 de nașteri. Anomalia este mult mai frecventă la produșii de concepție, dar cea mai mare parte a cazurilor de trisomie 13 sunt eliminate prin avort spontan.

Simptomatologie. *Nou-născutul* prezintă – în cazurile tipice – întârziere în creștere, microcefalie cu suturi larg deschise, aplazie cutanată în regiunea vertexului sau occiputului, frunte teșită, microftalmie/anoftalmie, colobom irian, despicături orofaciale, urechi malformate, polidactilie postaxială la mâini și/sau picioare (figura 11.4). Aproape constant se întâlnesc malformații ale SNC (arhinencefalie sau holoprozencefalie), ale cordului (80%) și sistemului urogenital.

Diagnosticul clinic este sugerat de triada caracteristică – *despicătură labio-palatină, microftalmie/anoftalmie și polidactilie postaxială* – observată la aproximativ 70% dintre pacienți. Absența unui element al triadei face diagnosticul mai dificil deși sunt și alte semne care pot evoca trisomia 13; de exemplu, proeminența rădăcinii și vârfului nasului, holoprozencefalia[15].

Analiza citogenetică este decisivă pentru diagnostic. Cariotipul pune în evidență, în circa 80% din cazuri, o trisomie 13 completă, liberă și omogenă, mozaicurile fiind foarte rare. În circa 20% de cazuri au fost identificate trisomii complete produse prin translocații Robertsoniene neechilibrate, de obicei rob(13;14) sau rob(13;13), din care jumătate sunt moștenite de la unul dintre părinți. Tehnicile rapide de citogenetică moleculară (FISH interfazică sau QF-PCR) pot fi folosite în cazul necesității unui diagnostic rapid sau al unui diagnostic retrospectiv, post-mortem.

Evoluție și prognostic. Malformațiile viscerale multiple și severe determină decesul a peste 50% dintre copii în prima lună de viață. Doar 3% din bolnavi supraviețuiesc peste un an, având un retard mental sever. Supraviețuirea este mai mare în trisomiile parțiale 13q.

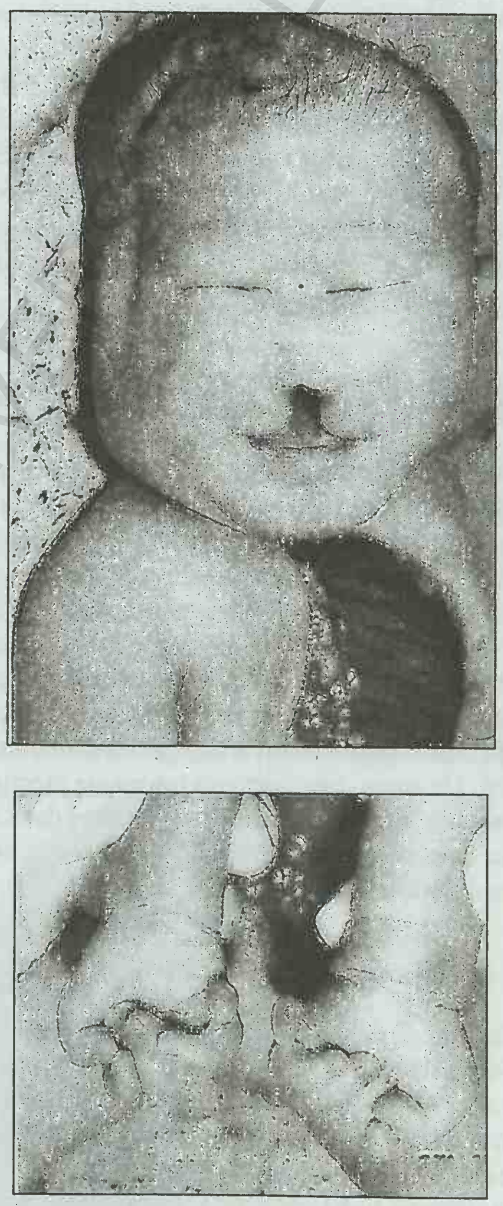


Figura 11.4. Aspect facial caracteristic (holoprosencefalie) și polidactilie la un nou-născut cu trisomie 13 (decedat neonatal)
(Colecția Centrului de genetică medicală Iași)

15. Holoprozencefalia este un defect al liniei mediane, afectând creierul (o singură emisferă cerebrală, ventricul cerebral unic, agenezie de corp calos), structurile oculare (microftalmie/anoftalmie) și mugurele frontal (modificările fronto-faciale pot fi severe cu ciclopie, *proboscis*, hipotelorism și despicătură velo-palatină mediană, sau minore cu hipotelorism și incisiv superior central unic).

Etiologie şi patogenie. Majoritatea trisomiilor 13 complete şi omogene sunt produse prin nedisjuncţie, cromozomul 13 suplimentar fiind de origine maternă, iar eroarea produsă în meioza I. Nu există încă date concludente referitoare la regiunile candidat şi genele corespunzătoare implicate în patogenia sindromului Patau.

Sfat genetic. În cazul trisomiilor libere, riscul de recurenţă al afecţiunii este foarte mic (sub 1%) spre deosebire de cel al trisomiilor prin translocaţii Robertsoniene dezechilibrate în care riscul poate fi de aproximativ 10% pentru translocaţiile între cromozomi neomologi, respectiv 100% în cazul translocaţiilor Robertsoniene între cromozomii 13. Prezenţa unei trisomii 13 fetale este sugerată de identificarea unei întârzieri marcate de creştere intrauterină, asociată cu depistarea malformaţiilor cerebrale (holoprozencefalia) sau viscerale. Analiza citogenetică a celulelor fetale stabileşte diagnosticul.

2. Sindroamele cu deleţii autozomale

Studiile citogenetice bazate pe marcajul în benzi al cromozomilor metafazici au dus la identificarea a numeroase deleţii cromozomiale. Incidenţa lor globală este redusă, circa 1/7.000 de naşteri. Cel mai frecvent sunt întâlnite în practică sindroamele *cri-du-chat* (5p-) şi Wolf-Hirschhorn (4p-). Deleţiile pot fi *de novo* sau moştenite, ca rezultat al transmiterii în formă neechilibrată a unei anomalii cromozomiale echilibrate (translocaţie sau inversie) prezentă la unul din părinţi. De aceea, este necesară totdeauna efectuarea cariotipului la părinţi, pentru a descoperi dacă unul dintre ei este sau nu purtător (situaţie în care riscul de recurenţă este crescut).

2.1. Sindromul „cri du chat"

Sindromul „*cri du chat*", descris de Jérôme Lejeune în 1963, este produs printr-o deleţie importantă a braţului scurt al cromozomului 5. Denumirea acestui sindrom derivă din particularitatea plânsului copiilor afectaţi, asemănător cu mieunatul de pisică[16].

Incidenţa bolii este de 1/15.000-1/50.000 de naşteri, dar prevalenţa sindromului la copii cu retard mental sever este de aproximativ 1%.

Simptomatologie. La sugar, semnele clinice sunt: întârziere a creşterii şi dezvoltării cu debut prenatal, plânsul monoton caracteristic, dismorfie cranio-facială cu microcefalie, facies rotund, hipertelorism, epicantus, urechi jos înserate, uneori cu tuberculi preauriculari, micrognaţie, boltă palatină ogivală (figura 11.5). Diagnosticul devine mai dificil odată cu înaintarea în vârstă a pacienţilor deoarece particularitatea plânsului se atenuează după vârsta de 2 ani, iar dismorfia facială se modifică. La copilul mare şi la adult microcefalia devine mai evidentă, iar dismorfia este caracterizată prin facies îngust şi alungit, proeminenţa arcadei supraorbitare, filtru scurt şi malocluzie dentară. Pacienţii prezintă un retard mental sever cu hiperactivitate, tendinţă la autoagresivitate, deficit al limbajului vorbit şi alterări senzoriale auditive şi vizuale. Deseori sunt asociate malformaţii cardiace şi genito-urinare.

Figura 11.5. Aspectul facial al unui copil cu sindrom *cri du chat*
(Colecţia Centrului de genetică medicală Iaşi)

Analiza citogenetică relevă deleţia 5p-, mărimea segmentului absent variind de la un pacient la altul şi fiind cuprinsă în intervalul 5p13-5p15.2. Deleţiile terminale de mărime variabilă au fost identificate la circa 80% din pacienţi, iar cele interstiţiale, ce interesează regiunea cromozomială 5p15.2, la aproximativ 10%. În restul cazurilor au fost depistate translocaţii neechilibrate (*de novo* sau moştenite), mozaicuri cu două sau mai multe linii celulare sau inversii.

Evoluţie şi prognostic. Afecţiunea evoluează cu un retard mental sever, iar supravieţuirea este variabilă. Mortalitatea este de circa 10%, 90% din decese survenind în primul an de viaţă.

Etiologie şi patogenie. Sindromul *cri du chat* este produs de monosomia parţială 5p-, întotdeauna fiind absentă banda 5p15. Deşi genele implicate în apariţia fenotipul caracteristic nu au fost identificate cu

16. Plânsul caracteristic se pare că este datorit asocierii anomaliilor laringiene cu un deficit funcţional neurologic.

BCU "VICTOR BABEŞ" UNIVERSITY LIBRARY

precizie, se știe că haploinsuficiența regiunii 5p15.2 determină majoritatea semnelor fenotipice, genele *SEMA5A* (semaforina F) și *CTNND2* (d-catenina) fiind probabil responsabile de retardul mental, în timp ce haploinsuficiența regiunii 5p15.3 determină hipoplazia laringiană ce produce plânsul caracteristic. Majoritatea cazurilor sunt sporadice, doar circa 15% din cazuri rezultând ca urmare a dezechilibrării meiotice a unei anomalii echilibrate existente la unul din părinți.

Sfat genetic. Riscul este minim pentru delețiile *de novo* și variabil (8-18%) atunci când unul dintre părinți are o translocație (vezi capitolul 9.C.3). Diagnosticul prenatal este util doar pentru cazurile familiale, afecțiunea nedeterminând modificări ecografice sau biochimice particulare.

2.2. Sindromul Wolf-Hirschhorn

Sindromul Wolf-Hirschhorn este un sindrom de gene contigue determinat de monosomia regiunii distale a brațului scurt al cromozomului 4 (4p-). Acest sindrom are o prevalență de circa 1/50.000 de nașteri, cu sex ratio F:M = 2:1.

Simptomatologie. Boala este caracterizată prin hipotrofie staturo-ponderală marcată, pre și postnatală, anomalii neurologice (hipotonie musculară severă și crize convulsive mioclonice), dismorfie facială caracteristică descrisă ca o *„cască de luptător grec"* (rădăcină nazală lărgită ce continuă direct fruntea, frunte înaltă cu proeminența glabelei, hipertelorism, epicantus, arcade sprâncenoase proeminente, anomalii ale urechii externe – jos inserate, helix plat, sinus preauricular – și micrognație) și deficit intelectual, constant și profund (figura 11.6). Malformațiile viscerale și cerebrale asociate sunt frecvente, de gravitate variabilă.

Analiza citogenetică. În funcție de mărimea regiunii deletate, anomalia cromozomială poate fi identificată pe cromozomii metafazici sau, în cazul suspiciunii clinice, necesită folosirea tehnicilor de înaltă rezoluție sau a celor de citogenetică moleculară (FISH). Analiza citogenetică a evidențiat în 75% din cazuri delеții sau microdelеții 4p *de* novo[17], în circa 12% alte anomalii cromozomiale *de novo* (cromozomi inelari, delеții în mozaic, translocații neechilibrate), iar în restul cazurilor delеții rezultând din malsegregarea meiotică a cromozomilor derivativi, în situația în care unul din părinți prezintă o anomalie cromozomială echilibrată. Datorită frecvenței mari a malsegregării este recomandată întotdeauna analiza cromozomială a părinților.

Etiologie și patogenie. Studiile genotip-fenotip au stabilit că spectrul manifestărilor clinice este determinat de mărimea regiunii deletate și de eventuala prezență a unui dezechilibru pe un alt cromozom (de exemplu duplicația unei regiuni cromozomiale prin translocație reciprocă dezechilibrată).

Analiza delețiilor de mărime variabilă terminale și interstițiale a permis identificarea unei regiuni responsabile de producerea manifestărilor caracteristice, regiune localizată la nivelul benzii cromozomiale **4p16.3**. La acest nivel au fost descrise două regiuni critice contigue, WHSCR-1 și WSHCR-2 (*Wolf-Hirschhorn Critical Region 1* și *2*). Analiza genelor situate în aceste regiuni a identificat gena *LETM1*[18]

Figura 11.6. a) Aspectul facial al unui copil cu sindrom Wolf-Hirschorn; b) cască de luptător grec
(Colecția Centrului de genetică medicală Iași)

17. Majoritatea delețiilor sunt terminale și prezente pe cromozomul 4 de origine paternă.
18. Gena *LETM1* (Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1) codifică un canal de calciu.

BCU IAȘI

ca genă candidat pentru crizele convulsive. Alte două gene, *FGFR3* şi *FGFRL1*, situate în afara acestei regiuni, ar putea fi responsabile de hipotrofia staturo-ponderală şi dismorfia facială caracteristică.

Evoluţie şi prognostic. Speranţa de viaţă este limitată, la 1/3 din cazuri decesul survenind în primii ani de viaţă datorită prematurităţii, malformaţiilor asociate (anomalii cardiace sau renale, hipoplazie pulmonară, hernie diafragmatică) sau infecţiilor respiratorii. Pacienţii care depăşesc vârsta de 1 an prezintă hipostatură, hipodonţie, retard psihomotor major (deseori nu merg sau mersul apare după vârsta de 3 ani, iar vorbirea este absentă sau limitată la câteva cuvinte). Progresele medicale realizate în îngrijirea acestor bolnavi au permis supravieţuirea până la vârsta adultă.

Sfat genetic. Numeroase cazuri sunt sporadice şi riscul de recurenţă este foarte mic. Uneori deleţia este consecinţa segregării unei translocaţii parentale [frecvent t(4;8)], riscul de recurenţă în acest caz fiind important. Diagnosticul prenatal este necesar când unul dintre părinţi prezintă o translocaţie echilibrată ce implică cromozomul 4. Depistarea prenatală a deleţiei 4p este de regulă întâmplătoare, aspectele ecografice ce impun efectuarea amniocentezei fiind: oligohidramniosul, retardul major al creşterii intrauterine, hernia diafragmatică, higroma chistică, şi hipoplazia renală bilaterală.

3. Sindroamele cu microdeleţii şi microduplicaţii cromozomiale

Sindroamele de microdeleţie şi microduplicaţie sunt produse prin pierderea sau câştigul unor fragmente cromozomiale mici (1-4 Mb), care nu pot fi detectate prin analiza citogenetică convenţională, ci numai prin FISH şi microreţele-CGH (vezi capitolul 2.D.3). Global, aceste sindroame constituie a treia cauză genetică de retard mental, după sindromul Down şi sindromul X fragil.

Studiile moleculare au arătat că punctele de ruptură ce caracterizează sindroamele cu microdeleţie/microduplicaţie frecvente sunt localizate în secvenţe repetitive scurte, identice (LCRs – *low copy repeats*) care flanchează un anumit segment cromozomial. Aceste secvenţe au un rol funcţional în schimburile intercromozomiale de material genetic. Prin alinierea şi împerecherea greşită a acestor secvenţe localizate pe cromozomii omologi, urmată de *crossing-over* inegal („recombinare omologă nealelică" – figura 6.17) rezultă deleţii sau duplicaţii ale segmentului respectiv („*aneusomie segmentară*").

Fenotipul sindroamelor cu microdeleţie este de obicei determinat de haploinsuficienţa uneia sau mai multor gene învecinate, situate în segmentul absent (figura 11.7); de aceea pentru denumirea acestor sindroame se mai utilizează termenul de **sindroame ale genelor contigue**. Spre exemplu, în sindromul Williams, în segmentul absent din regiunea 7q11.23, se află mai multe gene între care gena elastinei (*ELN*). Dacă haploinsuficienţa genei *ELN* explică modificările ţesutului conjunctiv (inclusiv anomaliile vasculare), genele responsabile de tulburările neurologice şi profilul psiho-comportamental caracteristice sindromului Williams nu au fost încă identificate. Conceptul de fenotip „agregat" este clar demonstrat de microdeleţia Xp21.1 ce asociază distrofie musculară, granulomatoză cronică şi retinită pigmentară. Trei gene localizate în această regiune (*DMD* – distrofina, *CYBB* – polipetidul β al citocromului B245 şi *RPGR* – *retinitis pigmentosa GTPase regulator*) sunt asociate acestui „agregat" fenotipic, mutaţii în fiecare din aceste gene producând o boală monogenică distinctă.

În regiunile cromozomiale implicate în sindroamele genelor contigue s-au identificat trei categorii de gene[19].

- *Gene ale căror alele mutante sunt dominante* – prin absenţa genei se produce o haploinsuficienţă ce determină un anumit caracter fenotipic anormal. Spre exemplu, absenţa genei *PAX6* în microdeleţia 11p13 produce aniridie, particularitate clinică a *sindromului WAGR*.

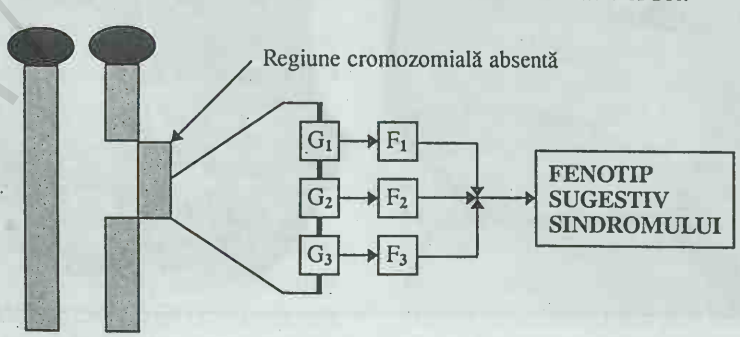


Figura 11.7. Mecanismul de producere al fenotipului în sindroamele prin microdeleţie

19. Studii recente au demonstrat că microdeleţiile pot determina modificări epigenetice ale genelor situate la nivelul fragmentului cromozomial modificat.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 11.4. Sindroame produse prin microdeleții sau microduplicații cromozomiale

Sindrom	Tip rearanjare	Mărime	Gene identificate
Monosomie 1p36	del(1)(p36)	0,5-5 Mb	*KCNAB2, MMP23, GABRD*
Del 1q21	del(1)(q21)	1,35 Mb	*HYDIN2, GJA5, GJA8*
Dup 1q21	dup(1)(q21)	1,35 Mb	*HYDIN2, GJA5, GJA8*
Del 1q41	del(1)(q41)	1,17 Mb	*DISP1*
Del 2p15	del(2)(p15)	3 Mb	*FANCL, REL*
Del 2q33	del(2)(q33)		*SATB2*
Del 2q37	del(2)(q37)	3 Mb	*COL6A3, UBE2F,PER2*
Del 3p25	del(3)(p25)	1 Mb	*SRGAP3, CHL1, CNTN4, LRRN1*
Del 3q29	del(3)(q29)	1,6 Mb	*UBXD7, DLG1*
Dup 3q29	dup(3)(q29)	1,6 Mb	*UBXD7, DLG1*
Del 5q35	del (5)(q35.3)	3,5 Mb	*PROP1, ADAMTS2, SQSTM1, FLT4*
Del 6p25	del(6)(p25)	2,1 Mb	*FOXC1, FOXF2, FOXQ1, EXOC2, IRF4, DUSP22*
Russel-Silver	dup(7)(p11.2)		*GRB10*
Williams	del(7)(q11.23)	1,6 Mb	*ELN, STX, CYLN2, LIMK1, RFC2, WSCR1*
Dup 7q11	dup(7)(q11)	1-5 Mb	*ELN, STX, CYLN2, LIMK1, RFC2, WSCR1*
Del 8p23.1	del(8)(p23.1)	3,4 Mb	*GATA4*
Dup 8p23.1	dup(8)(p23.1)	3,7 Mb	*GATA4, CHD, SOX7, TNKS*
CHARGE	del(8)(q12)	2-3Mb	*CHD7*
Langer-Giedion (triho-rino-falangian)	del(8)(q23q24)		*EIF3S3, RAD21, OPG, TRPSI, EXT1*
Del 9q34	del(9)(q34)	400 Kb-3 Mb	*EHMT1*
Del 10q23	del(10)(q23)	3 Mb	*PTEN, FAM35A MMRN2 MINPP1*
Potocky-Shaffer	del(11)(p11.2)	2,1 Mb	*EXT2, ALX4*
WAGR	del(11)(p13)		*PAX6, WT1*
Beckwith-Wiedemann	dup(11)(p15.5) (5% cazuri)		*IGF2, CDKN1C*
Del 12q14	del(12)(q14)	3,4 Mb	*LEMD3*
Prader-Willi	del(15)(q11-q13) pat (75% cazuri)	4,5 Mb	*SNRPN, NDN*
Angelman	del(15)(q11-q13) mat (70% cazuri)*	3,5 Mb	*UBE3A*
Del 15q13.3	del(15)(q13.3)	1,5 Mb	*CHNRA7*
Del 15q24	del(15)(q24)	1,7-3,9 Mb	*PML, SEMA7A, CSK, NRG,*
Del 15q26	del(15)(q26)	4 Mb	*IGFR1, MEF2A, CHSY1, TM2D3*
Dup 15q26	dup(15)(q26)		*IGFR1*
Del 16p11.2	del(16)(p11.2)	600 Kb-6 Mb	*SNP, QPRT, KIF22, MAZ, TBX6, MAPK3*
Dup 16p11.2	dup(16)(p11.2)	600 Kb	*SNP, QPRT, KIF22, MAZ, TBX6, MAPK3*
Del 16p13	del(16)(p13)	1,5 Mb	*NDE1, MYH11*
Dup 16p13	dup(16)(p13)	1,6-3,4 Mb	*NDE1, MYH11*
Rubinstein-Taybi	del(16)(p13.3) (20% cazuri)*		*CREBBP*
Miller-Diecker	del(17)(p13.3)	0,1-2,9 Mb	*LIS1, SKIP,CRK, YWHAE ş.a.*
Smith-Magenis	del(17)(p11.2)	4 Mb	*RAI1, NT5M, SGN3*
Potocki-Lupski	dup(17)(p11.2)	3,7 Mb	*RAI1, NT5M, SGN3*
Del 17q21	del(17)(q21)	650 kb	*MAPT*
Alagille	del(20)(p11-p12)		*JAG1*
Velo-cardio-facial/ DiGeorge tip I	del(22)(q11.2) (85% cazuri)	1,5-3 Mb	*TUPLE1, GSCL HIRA ş.a*
Velo-cardio-facial/ DiGeorge tip II	del(10)(p13) (15% cazuri)		*GATA3*
Dup 22q11.2	dup(22)(q11.2)	1,5-3 Mb	*TUPLE1, GSCL HIRA*
Phelan-McDermid	del(22)(q13)	160 Kb-9 Mb	*SHANK3*
Cat-eye	dup(22)(q11)		*CECR7*
Dup Xp11.22	dup(X)(p11.22)	0,8- 9,2 Mb	*MEGED4*
Deficit de steroid sulfatază	del(X)(p22.32)	1,5 Mb	*STS, MRX*
Kalmann	del(X)(p22.3)		*KAL1, STS*
DMD, CGD, RP, hipoplazie suprarenală	del(X)(q21)		*DMD, CGD, RP*
Discondrostoza Leri-Weill	del(X)(p22.32)	10 Kb-1 Mb	*SHOX*
Dup Xq28	dup(X)(q28)	0,4-0,8 Mb	*MECP2, LICAM*
Azoospermie	del(Y)(q11.23)	800 kb-3,2 Mb	*AZFa, AZFb, AZFc*

* Sindromul poate fi produs şi prin alte mecanisme (de exemplu, disomie uniparentală, mutații)

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

- *Gene ale căror alele mutante sunt recesive* – apariția caracterului fenotipic este posibilă doar în situația în care alela nulă produsă de deleția genei se asociază cu o mutație inactivatoare a alelei localizată pe cromozomul normal. De exemplu, absența unei alele a genei *WT1*, secundară unei microdeleții 11p13, determină apariția unei tumori Wilms și a anomaliilor genitale doar în situația în care alela genei *WT1* sitută pe cromozomul 11 omolog a suferit o mutație inactivatoare.
- *Gene cu amprentare genetică* – fenotipul este secundar instalării unei nulisomii funcționale sau a unei disomii funcționale a unei gene ce prezintă amprentare genetică și al cărei status funcțional normal este monoalelic. De exemplu, în *sindroamele Prader-Willi și Angelaman*, prin disomie uniparentală 15q11-q12, fenotipul este consecința unei nulisomii funcționale materne, respectiv paterne; pe de altă parte, în *sindromul Beckwith-Wiedemann*, prin disomie uniparentală 11p15 paternă, gena *IGF2* are activitate bialelică, ceea ce conduce la creșterea exagerată, caracteristică sindromului.

În ultimii ani, prin implementarea tehnicii array-CGH a fost posibilă stabilirea etiopatogeniei a numeroase sindroame plurimalformative determinate de microdeleții sau microduplicații cromozomiale[20]. Conform bazei de date DECIPHER[21] se cunosc astăzi mai mult de 50 de asemenea sindroame (tabel 11.4). Vom prezenta pe larg cele mai frecvente maladii: sindromul velo-cardio-facial, sindromul Prader-Willi și sindromul Williams. Subliniem că diagnosticul clinic prezumtiv este important în selecția cazurilor pentru FISH. De aceea se folosesc curent *scoruri de diagnostic* clinic.

3.1. Sindromul velo-cardio-facial

Sindromul velo-cardio-facial (SVCF) reprezintă un spectru fenotipic continuu, larg și variabil, produs în majoritatea cazurilor prin **microdeleția 22q11.2**. Acest spectru include: dismorfie facială sugestivă, voce nazală (prin despicătură palatină sau insuficiență velo-palatină), deficit imun (prin hipoplazia sau aplazia timusului), hipocalcemie (prin anomalii ale glandelor paratiroide), anomalii cardiace conotruncale, anomalii reno-urinare, anomalii scheletice, dificultăți de învățare, întârziere în dezvoltarea psihomotorie și tulburări psihice și altele.

Unele combinații ale acestor manifestări au fost descrise inițial ca entități distincte, cu denumiri diferite: *sindromul DiGeorge*, *sindromul velo-facial*, *sindromul anomalii conotruncale-față*, *sindromul velo-cardio-facial*; ulterior suprapunerea fenotipică parțială a acestor entități a devenit evidentă.

Pentru denumirea acestui spectru fenotipic, ce include mai multe entități clinice, s-a propus un acronim - **CATCH-22** – pe baza caracteristicilor clinice și genetice (*Cardiac anomalies*, *Abnormal facies*, *Thymic hypoplasia*, *Cleft palate*, *Hypocalcemia*, *22* – cromozomul afectat). Această denumire, utilă pentru rememorarea caracteristicilor clinice, nu a fost acceptată datorită conotației negative din limba engleză. Ulterior s-a optat pentru termenul de **sindrom velo-cardio-facial/DiGeorge,** care are avantajul că păstrează numele principalelor sindroame componente. În momentul de față este preferat termenul, mai simplu, de **sindrom velo-cardio-facial** considerând că sindromul DiGeorge (SDG) este o formă severă a SVCF și, exceptând prima copilărie, pacienții etichetați inițial cu SDG au un aspect caracteristic de SVCF.

Incidență. Datele epidemiologice actuale indică o incidență a SVCF (confirmat prin tehnici moleculare) cuprinsă între 1:2.000 și 1:4.000 nou-născuți, SVCF fiind *una din cele mai frecvente boli cromozomiale.* SVCF este cel mai frecvent sindrom asociat cu despicătură palatină (8% din copiii cu DP) sau cu malformații cardiace (5% dintre nou-născuții cu anomalii cardiace și 40% dintre cei cu tetralogie Fallot).

Manifestări clinice. SVCF se caracterizează printr-un spectru larg și variabil de manifestări fenotipice, atât ca intensitate, cât și ca vârstă de debut.

Malformațiile cardiace, ce sunt frecvente în SVCF (75-80%) și reprezintă deseori primul semn de diagnostic, au o gravitate diferită. Cele mai frecvente malformații sunt cele conotruncale: tetralogia Fallot, întreruperea de arc aortic, defect septal conoventricular, stenoză/atrezie de arteră pulmonară și trunchi arterial. Identificarea la un nou-născut a unei astfel de anomalii congenitale cardiace impune o evaluare clinică completă pentru depistare altor semne de SVCF și efectuarea unui test diagnostic.

Dismorfia cranio-facială nu este totdeauna evidentă la sugari însă devine mai pronunțată o dată cu creșterea vârstei: microcefalie, fața lungă, uneori asimetrică (la plâns) sau flască, arii malare șterse, nas lung și proeminent, retrognatism (figura 11.8.a).

20. Mecanismul principal de producere a acestor anomalii, prin *recombinare omoloagă nealelică* (mediată de secvențe LCR ce flanchează anumite segmente cromozomiale) postulează că frecvența duplicațiilor ar trebui să fie egală cu cea a delețiilor. Totuși duplicațiile au fost mai rar identificate, probabil prin faptul că determină un fenotip de ACM/RM mai blând; studiile recente cu microrețele CGH au confirmat această ipoteză, aratând că frevența duplicațiilor este mai mare decât a fost stabilită de evaluările inițiale.
21. DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources - http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/.

BCU CENTRALA UNIVERSITARA

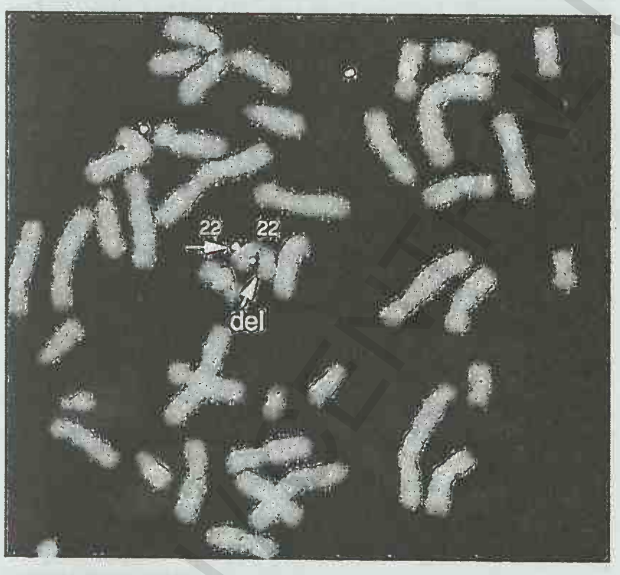


Figura 11.8. a) Aspectul facial al unui copil cu SVCF; b) microdeleția 22q11 demonstrată prin FISH
(Colecția Centrului de genetică medicală Iași)

Anomaliile palatului sunt frecvente (60-85%), dar gama de modificări variază de la secvența Robin (cu despicătură palatină evidentă) până la integritate structurală a palatului, dar cu grade diferite de insuficiență velo-faringiană, ce determină refluarea lichidelor pe nas în timpul suptului sau înghițitului, precum și vorbirea nazală.

Anomaliile endocrine și imunologice. Hipocalcemia neonatală (manifestă prin convulsii, tremor, rigiditate), consecința unui hipoparatiroidism congenital, poate fi cel mai precoce și unicul semn la sugar în formele medii de SVCF. Aplazia timică (și secundar susceptibilitatea la infecții grave, letale) este un semn cardinal pentru forma DiGeorge a SVCF. Totuși, hipolazia timusului și formele moderate de imunodeficiență (a numărului/funcției limfocitelor T) sunt comune în SVCF, mai ales la sugari și la copii mici. Aceasta impune o evaluare imunologică atentă a copiilor suspecți de SVCF.

Alte particularități fenotipice ale SVCF sunt: hipostatura (33%), anomaliile musculo-scheletice (60%), anomaliile uro-genitale (37%), surditatea (de conducere și neuro-senzorială), anomaliile neurologice.

Dezvoltarea psihomotorie și în special dezvoltarea limbajului este întârziată. Un retard mental ușor sau moderat este prezent la 40% dintre pacienți, dar tulburări de comportament variabile și dificultăți școlare importante au fost descrise la 70-90% din cazuri. La 10-22% dintre adolescenții și adulții cu SVCF se întâlnesc tulburări psihiatrice majore.

Diagnosticul clinic de SVCF este dificil datorită *spectrului larg și variabil de manifestări fenotipice.*

> Pacienții pot manifesta forma gravă a sindromului DiGeorge, formă ce poate fi letală în absența unei intervenții medicale adecvate (datorită malformațiilor cardiace și/sau deficiențelor imune), fenotipuri intermediare (ca în SVCF clasic) sau numai tulburări ușoare de dezvoltare și anomalii faciale subtile sau vorbire nazală cu hipoparatiroidism tranzitoriu. Un alt element ce trebuie subliniat este *relația dintre vârsta pacientului și manifestarea caracterelor* clasice ale VCFS: aspectul facial tipic poate să nu fie evident în primul an de viață, tulburările de vorbire sau învățare pot apărea tardiv, iar vârful nasului lat/bulbos este evident la tineri și la adulți. În general, suspiciunea de sindrom VCFS trebuie avută în vedere atât la noi-născuți/sugari cu anomalii cardiace cono-truncale și/sau secvență Robin, cât și la copii mai mari cu întârzieri în dezvoltare și anomalii faciale sau ORL, dar fără semnele cardinale ale VCFS.

Pentru a ușura evaluarea clinică a pacienților cu sindrom VCFS a fost stabilit un scor de diagnostic (tabelul 11.5.) care permite selecția corectă a cazurilor, pentru aplicarea testelor moleculare.

Diagnosticul diferențial se va face cu alte sindroame: tricho-rhino-falangian, Langer-Giedion, Stickler, cerebro-costo-mandibular, alcoolismului fetal, embriopatia retinoică, distrofia miotonică, și duplicația 22q11.2 care, toate, prezintă elemente clinice comune cu SVCF.

Diagnosticul citogenetic. Analiza cromozomială clasică confirmă diagnosticul prin identificarea unei anomalii cromozomiale dezechilibrate ce interesează regiunea 22q11 doar la circa 15% din pacienți,

Tabel 11.5. Algoritm de diagnostic al sindromului velo-cardio-facial

(după McDonald-McGinn *et al.*, 2001)

CRITERII DE EVALUARE	
CREŞTERE ŞI DEZVOLTARE **1 criteriu = ½ punct**	**STATUS CARDIOVASCULAR** **1 criteriu = 1 punct**
1. Convulsii neonatale 2. Retard al creşterii 3. Retard mental moderat 4. Tulburări comportamentale	1. Tetralogie Fallot 2. Arc aortic întrerupt 3. Trunchi arterial comun 4. Inel vascular 5. Defect septal atrial/defect septal ventricular 6. Stenoză pulmonară 7. Alte anomalii
FENOTIP CRANIOFACIAL **4 criterii = 1 punct**	
1. Microcefalie 2. Facies lung posibil asimetric 3. Fante palebrale scurte/antimongoloide 4. Ptoză palpebrală/strabism 5. Colobom irian 6. Hipertelorism 7. Hipoplazie malară 8. Nas lung proeminent/vârf bulbos	9. Hipoplazia aripioarelor nazale 10. Atrezie coanală 11. Filtrum scurt 12. Microstomie/gura în bot peşte 13. Urechi jos inserate/urechi protuberante 14. Anomalii ale helixului 15. Micrognatism/retrognatism 16. Laringomalacie, voce nazală
ANOMALII ALE PALATULUI **1 criteriu = 1 punct**	**HIPOPARATIROIDISM** **1 criteriu = 1 punct**
1. Incompetenţă velo-faringiană 2. Despicătură palatină submucoasă 3. Despicătură palatină 4. Uvulă bifidă 5. Despicătură labială/labiopalatină 6. Despicătură palatină ocultă	1. Hipoparatiroidism 2. Hipocalcemie
DEFICIT IMUN **1 criteriu =1 punct**	**ALTE ANOMALII** **1 criteriu = ½ punct**
1. Hipoplazie/aplazie de timus 2. Deficit de Ig 3. Infecţii recurente 4. Boli autoimune	1. Anomalii genitale 2. Anomalii urinare 3. Anomalii ale degetelor
Pentru diagnosticul pozitiv de sindrom velo-cardio-facial este necesar un scor ≥ 3.	

microdeleţia fiind prea mică pentru a fi identificată prin marcaj cromozomial. *Analiza citogenetică moleculară*, folosind sonde FISH specifice regiunii 22q11, pune în evidenţă microdeleţii localizate în această regiune şi atestă diagnosticul de SVCF (figura 11.8.b). În aproximativ 15% din cazuri analiza FISH cu sondele curent utilizate este negativă. În aceste cazuri microdeleţii atipice ale regiunii 22q11 pot fi puse în evidenţă prin folosirea altor tehnici de citogenetică moleculară (microreţele-CGH, Q-PCR sau MLPA) sau a analizei markerilor polimorfici localizaţi în această regiune. În rare cazuri pot fi identificate microdeleţii ce afectează regiunea 10p13-p14, microdeleţii ce sunt asociate cu un fenotip de sindrom DiGeorge. Dacă analizele citogenetice evidenţiază deleţia 22q11 atunci *vor fi investigaţi ambii părinţi*, deoarece într-un număr semnificativ de cazurile de SVCF deleţia este prezentă la unul din părinţi (exceptând cazurile rare de mozaicism germinal).

Evoluţie şi prognostic. Circa 8% din pacienţi decedează în primele 6 luni, în special din cauza malformaţiilor cardiace sau a deficienţei imune severe. Un procent variabil din pacienţi au un retard mental uşor, dar majoritatea prezintă o întârziere în apariţia vorbirii şi dificultăţi de învăţare. Nu există nici un element predictiv valabil al expresiei şi evoluţiei clinice, dar există posibilităţi eficace de intervenţie medicală, psihologică sau educaţională care pot corecta multe din manifestările bolii.

Etiopatogenie. Studiile recente privind etiopatogenia SVCF au demonstrat că majoritatea pacienţilor (80-95%) cu SVCF au *deleţii de mărime variabilă* în regiunea 22q11.2. Deşi mărimea deleţiei la persoanele afectate este variabilă, frecvent între 1,5-3 Mb, nu există nici o corelaţie între mărimea deleţiei şi fenotip. La 72-94% din pacienţi deleţia se produce *de novo*, este *sporadică*. Restul pacienţilor *moştenesc deleţia* de la unul din părinţi, mai frecvent de la mamă, care poate avea semne fenotipice minore. Se presupune că regiunea absentă conţine gena/genele care determină fenotipul SVCF, principalele gene candidat fiind *TBX1*, *GSCL*, *SLC25A1*, *CLTD*, *HIRA* şi *TMVCF*. O parte dintre aceste gene joacă un rol important în controlul migrării celulelor crestei neurale

BCU "VICTOR BABEŞ" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

şi în diferenţierea acestora. Un rol patogenic major se pare că îl are gena *TBX1*, aspect dovedit de existenţa cazurilor de SVCF produse de mutaţii punctiforme ale acestei genei.

Descifrarea patogeniei sindromului VCFS este departe de a fi încheiată. Majoritatea structurilor şi organelor afectate la pacienţii cu VCFS (regiunea facială, cordul, timusul şi glandele paratiroide) derivă embriologic din arcurile şi pungile faringiene III şi IV a căror organogeneză este modificată de un *defect în diferenţierea şi/sau migrarea celulelor crestei neurale craniale*. Totuşi, o parte din caracterele clinice asociate SVCF nu pot fi explicate numai printr-un defect al celulelor crestei neurale. Elucidarea patogeniei este complicată de variabilitatea fenotipică, imposibil de corelat cu dimensiunile deleţiei, dar şi de discordanţa la gemenii monozigoţi care presupune intervenţia unor factori de mediu. Etiopatogenia VCFS va fi înţeleasă complet doar când vor fi cunoscute structura şi funcţiile genelor din regiunea 22q11.2. Un pas înainte în acest demers îl reprezintă identificarea microduplicaţiei 22q11.2 al cărui fenotip se suprapune parţial peste SVCF (retard mental, hipotrofie staturo-ponderală, hipotonie, dismorfie facială diferită).

La circa 15% din pacienţi cu fenotip de SVCF nu este posibilă detecţia unei deleţii prin analiză citogenetică convenţională sau moleculară. Investigarea suplimentară a acestor pacienţi impune folosirea unor tehnici de înaltă rezoluţie capabile să depisteze deleţii foarte mici (atipice) în regiunea critică, utilizarea analizei moleculare pentru detecţia mutaţiilor punctiforme ale genei *TBX1* sau folosirea de sonde FISH pentru regiunea 10p13-p14, a cărei microdeleţie determină un fenotip asemănător SVCF (heterogenitate genetică). Fenotipul pacienţilor cu microdeleţie 10p13-p14 include dismorfie facială, hipoplazie de timus şi paratiroide, anomalii urogenitale, retard mental moderat/sever, hipotrofie staturo-ponderală marcată, surditate neurosenzorială, dar malformaţiile cardiace sunt rar întâlnite. Dacă nici una din metodele menţionate mai sus nu confirmă supoziţia clinică trebuie luată în considerare o fenocopie produsă de agenţi teratogeni.

Sfatul genetic. Acordarea sfatului genetic în SVCF este dependentă de tipul de anomalie identificată la pacientul investigat. Astfel, riscul de recurenţă pentru un cuplu care are un copil cu SVCF *de novo* este similar riscului populaţiei generale (între 1:2.000--1:4.000 nou-născuţi) (deşi un mozaic germinal nu poate fi eliminat). Riscul de recurenţă ajunge la 50% dacă unul din părinţi are o anomalie cromozomială (microdeleţie 22q11 sau anomalie vizibilă prin cariotip standard) sau o mutaţie a genei *TBX1* (cu transmitere după modul autozomal dominant).

Diagnosticul prenatal este indicat în două situaţii:

- la cuplurile cu un istoric familial pozitiv de SVCF şi la care o microdeleţie 22q11.2 a fost deja identificată fie la un copil cu SVCF, fie la unul din părinţi;
- în cazul identificării ecografice la făt, prin *screening*-ul ecografic, a unui defect cardiac conotruncal sau a unei despicături labio-palatine la cupluri fără un istoric familial pozitiv de SVCF.

Diagnosticul prenatal este realizat prin tehnica FISH folosind sonde specifice regiunii 22q11.2, fie prin examenul celulelor fetale (necultivate sau cultivate).

3.2. Sindromul Prader-Willi

Sindromul Prader-Willi, determinat de absenţa expresiei genelor paterne din regiunea amprentată 15q11.2-q13, are o incidenţă de 1:10.000-1:22.000 nou-născuţi.

Manifestările clinice: Hipotonia este semnul clinic major din sindromul Prader-Willi în perioada prenatală şi neonatală însă diminuă ulterior în severitate. În perioada prenatală se poate observa o scădere a intensităţii mişcărilor fetale, iar după naştere sunt evidente suptul dificil şi dificultăţile de alimentaţie ce pot impune gavajul. După vârsta de 1 an apare hiperfagia şi creşterea rapidă în greutate, cu instalarea unei obezităţi de tip central. Dismorfia craniofacială este necaracteristică, principalele elemente fiind dolicocefalia, îngustarea diametrului bifrontal, ochii migdalaţi, microstomia cu buză superioară subţire şi comisuri bucale coborâte (figura 11.9.a).

Fenotipul sindromului este completat de retardul global al dezvoltării, hipostatură, acromicrie (mâini şi picioare mici), dificultăţi de învăţare, retard mental moderat cu tulburări comportamentale (accese de furie, reacţii violente, atitudine obsesivă, tendinţe spre argumentare, opoziţie, rigiditate, posesivitate, încăpăţânare, tendinţă la minciună şi furat, în special în scopul obţinerii de alimente).

Hipogonadismul este un element obligatoriu în sindromul Prader-Willi, fiind caracterizat prin: hipoplazie genitală în copilărie (la băieţi: hipoplazie scrotală, criptorhidie, micropenis, microrhidie; la fete: absenţa labiilor mari, hipoplazia labiilor mici şi a clitorisului) şi deficit de sexualizare secundară postpubertar (la bărbaţi – microrhidie, pilozitate sexuală redusă, voce înaltă; la femei – menstruaţie neregulată sau absentă).

Suspiciunea de diagnostic trebuie luată în considerare la nou-născuţii cu hipotonie severă şi dificultăţi de alimentare, respectiv la copii care dezvoltă obezitate prin hiperfagie. Aplicarea scorului clinic de diagnostic permite selecţia corectă a cazurilor, aspect important pentru aplicarea testelor moleculare (tabel 11.6).

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

Tabel 11.6. Scor de diagnostic al sindromului Prader-Willi

(după McCandless şi Cassidy, 2006)

CRITERII DE EVALUARE	
CRITERII MAJORE **1 citeriu = 1 punct**	**CRITERII MINORE** **1 citeriu = 1/2 punct**
1. Hipotonie neonatală şi infantilă, supt dificil 2. Dificultăţi de alimentare, greutate mică în perioada de sugar 3. Creştere rapidă şi excesivă a greutăţii între 1-6 ani 4. Dismorfism facial: dolicocefalie în perioada de sugar, îngustarea diametrului bifrontal, ochi migdalaţi, gură mică cu buză superioară subţire, comisuri bucale coborâte (≥ 3 **elemente = 1 punct**) 5. Hipogonadism – oricare din elemente **a.** hipoplazie genitală (hipoplazie scrotală, criptorhidie, micropenis, testicule mici; absenţa labiilor mari, hipoplazia severă a labiilor mici, hipoplazia severă a clitorisului) **b.** deficit de sexualizare secundară după vârsta de 16 ani (testicole mici, pilozitate sexuală redusă, voce neschimbată; menstruaţie neregulată sau absentă). 6. Retard global al dezvoltării (la copilul mai mic de 6 ani); retard mental moderat; dificultăţi la învăţare (la copilul mai mare). 7. Hiperfagie	1. Scăderea intensităţii mişcărilor fetale; letargie infantilă sau plânset slab, atenuate cu vârsta 2. Tulburări comportamentale (accese de furie, reacţii violente, mint, fură, atitudine obsesivă, tendinţe spre argumentare, opoziţie, rigiditate, posesivitate, încăpăţânare) (**5 elemente = 1/2 punct**) 3. Tulburări de somn sau apnee în somn 4. Statură mică după vârsta de 15 ani (în absenţa terapiei cu hormon de creştere) 5. Hipopigmentarea părului şi a pielii (comparativ cu ceilalţi membrii ai familiei) 6. Mâini mici (< p 25) şi/sau picioare mici (< p 10) (la copilul de vârstă mare) 7. Mâini înguste, în continuarea liniară a cubitusului 8. Genum valgum 9. Anomalii oculare: esotropie, miopie, strabism 10. Salivă vâscoasă, cruste ale comisurilor bucale 11. Defecte de articulare ale cuvintelor 12. Ciupirea pielii 13. Indiferenţă la durere
Pentru diagnosticul pozitiv de sindrom Prader-Willi sunt necesare: 0 ani-3 ani = 5 puncte, din care 4 din criterii majore 3 ani-adult = 8 puncte, cu cel puţin 5 din criterii majore	

Datorită suprapunerii parţiale a fenotipului sindromului Prader Willi cu cel al altor sindroame, **diagnosticul diferenţial** trebuie să includă entităţi patologice care prezintă elemente comune: distrofie miotonică congenitală, atrofie musculară spinală, sindrom Angelman, sindrom Rett, craniofaringiom, osteodistrofia ereditară Albright, sindrom Laurence-Moon--Bardet-Biedl, sindrom Cohen. Elucidarea etiologiei sindromului Prader-Willi este asigurată de efectuarea testelor citogenetice sau moleculare.

Diagnostic citogenetic şi molecular. Suspiciunea clinică de sindrom Prader-Willi necesită, într-o primă etapă, efectuarea studiului molecular al metilării regiunii 15q11.2-q13. Prezenţa anomaliilor de metilare confirmă diagnosticul de sindrom Prader-Willi, iar cariotipul, efectuat concomitent sau ulterior, permite evidenţierea, în aproximativ 1% din cazuri, a unor anomalii cromozomiale structurale ce pot afecta regiunea 15q11.2-q13 (deleţii de talie mare, duplicaţii, translocaţii reciproce) (figura 11.9.b). În cazul absenţei anomaliilor cromozomiale vizibile prin tehnicile citogenetice de marcare în benzi este necesar studiul prin tehnica FISH, cu sonde specifice regiunii 15q11.2-q13 ce includ gena *SNRPN*, sau prin PCR cantitativ, studiu ce permite evidenţierea microdeleţiilor regiunii critice pe cromozomul patern în aproximativ 75% din cazuri. În cazul absenţei anomaliilor cromozomiale vizibile şi a microdeleţiilor este necesară investigarea, prin tehnici de genetică moleculară, a unei posibile disomii uniparentale materne rezultată prin corecţia unei trisomii 15 ca urmare a pierderi cromozomului 15 patern. Acest mecanism, ce reprezintă a doua cauză ca frecvenţă a sindromului Prader-Willi, este evidenţiat la aproximativ 20% din pacienţi. Anomaliile mecanismului de amprentare trebuiesc luate în considerare la pacienţii la care nu s-au identificat anomalii cromozomiale sau disomie uniparentală, pacienţi ce reprezintă mai puţin de 5%. Studiul prin MLPA sau Q-PCR al regiunii de control al amprentării poate evidenţia, în rare cazuri, deleţii de talie foarte mică însă, în majoritatea cazurilor, expresia uniparentală maternă a genelor din regiunea critică este asociată prezenţei alelelor biparentale

Evoluţie şi prognostic. Depăşirea în bune condiţii a perioadei neonatale impune tehnici speciale de alăptat sau gavajul, în scopul asigurării unei nutriţii adecvate în perioada de sugar. În copilărie este necesară aplicarea unei terapii cu hormon de creştere care normalizează greutatea. Terapia cu STH îmbunătăţeşte şi talia finală, în condiţiile în care este documentată hiposecreţia endogenă de hormon somatotrop. De asemenea, monitorizarea greutăţii, instituirea unei diete şi a unui program de exerciţii fizice sunt absolut necesare în contextul hiperfagiei, care se poate solda cu obezitate. Deficienţele de vorbire trebuie evaluate, iar instituirea unui program educaţional îmbunătăţeşte statusul comportamental. Tulburările de comportament se pot accentua la pubertate şi la vârsta adultă, terapia medicamentoasă cu inhibitori de serotonină fiind necesară. Terapia cu calciu este eficientă pentru prevenirea osteoporozei. Tulburările de somn pot beneficia de terapie medicamentoasă. Manifestările

psihotice de tip maniaco-depresiv pot apărea la adult şi necesită evaluare şi terapie psihiatrică. La vârsta adultă obezitatea este elementul principal al morbidităţii, fiind răspunzătoare de insuficienţa cardio-pulmonară, diabetul zaharat tip II, tromboflebite, edeme cronice. Obezitatea şi complicaţiile ei sunt factorii care contribuie la rata crescută a mortalităţii pacienţilor cu sindrom Prader-Willi. Evitarea obezităţii prin dietă, exerciţii şi programe instituite în copilărie se soldează cu o longevitate normală. Din păcate, hiperfagia nu poate fi controlată medicamentos.

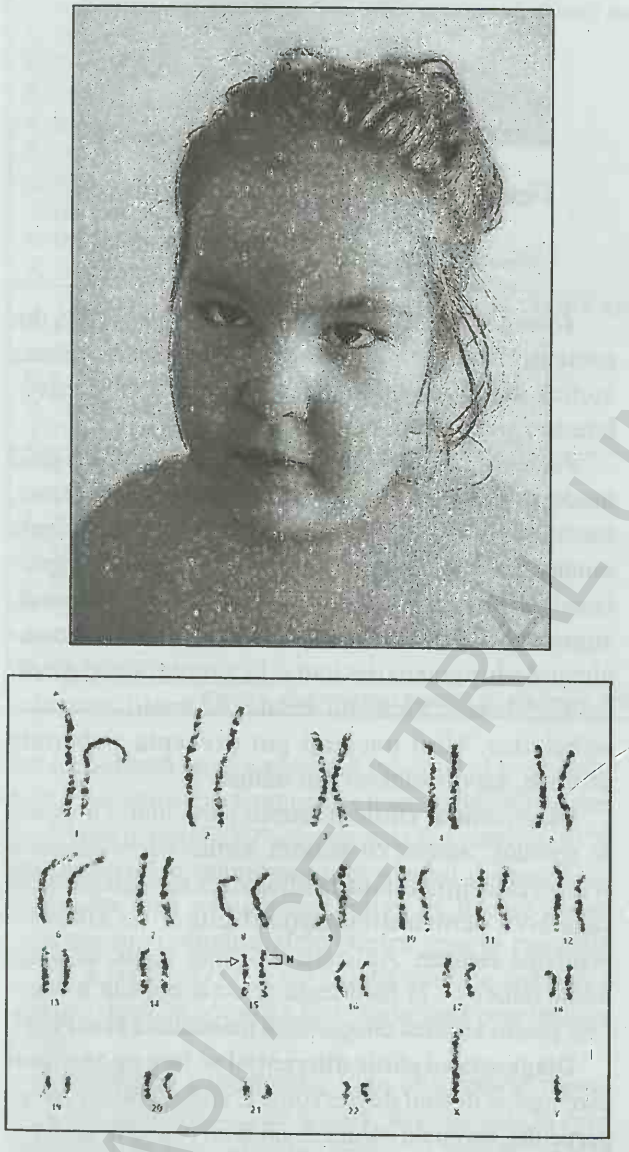


Figura 11.9. a) Aspectul facial al unui copil cu sindromul Prader-Willi; b) deleţia microscopică a regiunii 15q11.2-q13 în sindromul Prader-Willi
(Colecţia Centrului de genetică medicală Iaşi)

Etiopatogenie. Sindromul Prader-Willi este determinat de absenţa expresiei alelelor paterne ale unor gene localizate în regiunea 15q11.2-q13. Diagnosticul de sindrom Prader-Willi este confirmat de evidenţierea anomaliilor moleculare de metilare ale unor secvenţe din regiunea critică (prezenţa numai a secvenţelor metilate de origine maternă), anomalii prezente în cele trei mari tipuri etiologice de sindrom Prader-Willi: microdeleţiile paterne, disomia uniparentală şi anomaliile mecanismului de amprentare.

Regiunea corespunzătoare deleţiei comune în sindromul Prader-Willi are aproximativ 4,5 Mb lungime, însă există şi deleţii mai mari sau mai mici fără ca diferenţe fenotipice evidente să existe între pacienţii purtători ai acestor diferite tipuri de deleţii. Regiune comună conţine domeniul de control al amprentării şi un mare număr de gene, amprentate (*SNRPN*, *PAR1*, *UBE3A*, *IPW*, *NDN*, *MAGEL2*, *MKRN3*) sau nu (*OCA2*, *GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3*). Cu toate că unele gene din această regiune sunt considerate ca gene candidat responsabile de manifestările clinice specifice acestui sindrom, patogenia exactă a sindromului Prader-Willi nu este încă elucidată.

Gena *SNRPN* are expresie paternă, iar deleţii mici ale regiunii promotor a genei *SNRPN* au fost identificate la pacienţii cu sindromul Prader-Willi fără deleţie paternă a regiunii critice sau fără disomie uniparentală maternă. Gena *UBE3A* este, de asemenea, amprentată însă este exprimată de alela maternă, absenţa ei fiind caracteristică sindromului Angelman produs de absenţa expresiei alelelor materne ale regiunii 15q11.2-q13. Genele *NDN* şi *MAGEL2* au expresie paternă şi rol în coordonarea ciclului celular şi a apoptozei, însă rolul lor în realizarea fenotipului caracteristic acestui sindrom nu este elucidat. Genele *GABRB3*, *GABRA5* şi *GABRG3*, care nu sunt amprentate, codifică subunităţi ai receptorilor membranari pentru neuromediatorul GABA. Gena *OCA2*, ale cărei mutaţii sunt asociate albinismului oculocutanat tirozinază-pozitiv (tip II), este responsabilă de hipopigmentarea observată la aproximativ o treime din pacienţii cu sindrom Prader-Willi.

Sfatul genetic. Riscul de recurenţă depinde de mecanismul cauzal al sindromului, fiind sub 1% pentru microdeleţiile *de novo* şi disomia uniparentală maternă şi de 50% în defectele centrului de amprentare. Majoritatea indivizilor afectaţi nu se reproduc, dar riscul unui copil de a fi afectat, în cazul unei anomalii familiale, depinde de cauza afectării parentale şi de sexul părintelui afectat. În cazul unei microdeleţii moştenite, riscul de recurenţă este de 50%, copiii pacientului putând prezenta fie un sindrom Prader-Willi – dacă părintele purtător al deleţiei este tatăl, fie un sindrom Angelman – dacă părintele purtător al deleţiei este mama. În cazul disomiei uniparentale materne există riscul teoretic pentru trisomie 15 şi sindrom Prader-Willi – dacă mama este afectată şi sindrom Angelman – dacă tatăl este afectat. Pacientul cu sindrom Prader-Willi prin mutaţii ale centrului

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de amprentare are un risc teoretic de 50% de a avea un copil afectat. Identificarea unei mutații a centrului de amprentare sau a unei translocații la pacient și unul din părinți trebuie urmată de oferirea opțiunii pentru diagnostic și sfat genetic în familia părintelui purtător.

Diagnosticul prenatal este posibil pentru toate tipurile de etiologii, dar trebuie considerat doar după identificarea mecanismului molecular la cazul index și acordarea sfatului genetic privind riscul de recurență.

Diagnosticul prenatal este indicat la cuplul cu un copil afectat prin defecte de amprentare datorită riscului crescut de recurență. În cazul translocațiilor echilibrate cu punct de ruptură în regiunea critică, diagnosticul prenatal pentru cuplul cu un copil afectat este relevant, considerând riscul teoretic de recurență de 10-20%. Suspiciunea de deleție a regiunii 15q11.2-q13 în urma analizei citogenetice prenatale trebuie confirmată prin tehnici de citogenetică moleculară (FISH cu sonde specifice regiunii) și de analiza originii parentale a cromozomului implicat.

Trisomia 15 sau trisomia 15 în mozaic (identificate prin puncția vilozităților coriale), dar neconfirmate prin analiză cromozomială post-amniocenteză se asociază cu un risc de disomie uniparentală maternă sau paternă prin pierderea unui cromozom 15. În acest caz se impune investigarea originii parentale a cromozomilor 15 prin teste de genetică moleculară. Identificarea unui cromozom marker 15, a unui cromozom dicentric 15, a unei translocații Robertsoniene ce implică cromozomul 15 sau a unei alte anomalii implicând cromozomul 15 pot fi predictive pentru o deleție/duplicație a regiunii critice sau o disomie uniparentală și necesită investigarea compoziției genice a cromozomilor derivați (prin FISH sau alte tehnici moleculare) și identificarea originii parentale a cromozomilor 15.

3.3. Sindromul Williams-Beuren

Sindromul Williams-Beuren, determinat de microdeleția regiunii 7q11.23, se caracterizează prin dismorfie facială caracteristică, retard mental moderat, profil cognitiv particular, anomalii cardiovasculare, hipercalcemie și/sau hipercalciurie. Incidența bolii este de 1:7.500 de nou-născuți.

Manifestările clinice. *Dismorfia facială* din sindromul Williams este caracterizată prin facies „de spiriduș", cu frunte lată și îngustare bitemporală, proeminența ariei periorbitale, epicantus, strabism, iris stelat, anomalii ale vaselor retiniene, rădăcină nazală deprimată, nas scurt, cu vârf rotund și narine anteversate, hipoplazie malară, filtrum lung; copiii mici au obrajii bucălați și mici; adulții au un facies lung, buze groase, gură largă, malocluzie, dinții mici și spațiați (figura 11.10).

Figura 11.10. Aspectul facial al unui copil cu sindrom Williams-Beuren
(Colecția Centrului de genetică medicală Iași)

Anomalii cardiovasculare variate apar la 80% din pacienți, tipic pentru acest sindrom fiind stenoza aortică supravalvulară, existând însă și forme valvulare sau subvalvulare.

Pacienții cu sindrom Williams-Beuren au un grad moderat de *retard mental*, cu dificultăți de învățare, memorie de scurtă durată bună, dar cu deficiențe semnificative în orientarea temporo-spațială. Comportamentul particular include atitudine prietenoasă, anxietate, deficit de atenție. Tabloul clinic este completat de hipersenzitivitatea la sunete, otite medii cronice, hernii, anomalii renale, anomalii musculo-scheletice. Unii pacienți pot prezenta pubertate precoce, hipotiroidism sau diabet.

Diagnosticul clinic. Faciesul particular, cu aspect de spiriduș, asociat cu stenoza aortică supravalvulară și hipercalcemia infantilă idiopatică sunt elementele sugestive pentru diagnosticul clinic de sindrom Williams-Beuren. Aplicarea scorului clinic de diagnostic (tabel 11.7) facilitează selecția corectă a cazurilor pentru testarea citogenetică moleculară prin FISH.

Diagnosticul clinic diferențial se face cu afecțiuni care includ deficit de dezvoltare, statură mică, facies particular, anomalii cardiace: sindrom Noonan, sindrom DiGeorge/velo-cardio-facial, sindrom Smith-Magenis, sindrom Kabuki, sindrom alcoolic fetal. Mutațiile sau delețiile genei *ELN* creează doar modificări ale țesutului conjunctiv, precum stenoza aortică supravalvulară și *cutix laxa*, și au o transmitere dominant autozomală.

Diagnostic citogenetic molecular. Metoda de diagnostic care certifică suspiciunea clinică este testul FISH cu sonde specifice regiunii critice 7q11.23, regiune care include genele *ELN* și *LMK1*. Deleția a

Tabel 11.7. Scor de diagnostic al sindromului Williams-Beuren

(după Committee on Genetics – American Academy of Pediatrics – Health Care Supervision for Children With Williams Syndrome 2001, 2002)

CRITERII DE EVALUARE	
CREŞTEREA **(prenatală şi postnatală)** **3 criterii din 5 = 1 punct**	**DEZVOLTAREA ŞI COMPORTAMENTUL** **3 criterii din 6 = 1 punct**
1. Naştere postmatură > 41 săptămâni de gestaţie. 2. Retard al creşterii şi greutăţii < percentilul 5 3. Vărsături sau reflux gastroesofagian 4. Colici abdominale prelungite > 4 luni 5. Constipaţie cronică	1. Personalitate extrem de sociabilă 2. Hipersensibilitate la sunete 3. Anxietate 4. Retard psihosomatic 5. Probleme vizuale spaţiale 6. Retard al vorbirii, ulterior logoree
FENOTIP FACIAL **8 criterii din 17 = 3 puncte**	
1. Îngustare bitemporală 2. Epicantus sau punte nazală deprimată 3. Strabism prezent sau corectat 4. Nas mic sau narine anteversate 5. Obraji proeminenţi 6. Filtrum lung 7. Gură largă 8. Dinţi mici şi spaţiaţi 9. Lobii urechilor proeminenţi	10. Sprâncene late 11. Regiune periorbitală proeminentă 12. Iris stelat 13. Vârf nazal rotund, bulbos 14. Hipoplazie malară 15. Buze groase, proeminente 16. Malocluzie 17. Mandibulă mică
STATUS CARDIOVASCULAR	
A. 1. Stenoză aortică supravalvulară 2. Stenoză pulmonară supravalvulară	**1 criteriu din 2 = 5 puncte**
B. 1. Alte malformaţii cardiace 2. Suflu cardiac 3. Hipertensiune	**1 criteriu din 3 = 1 punct**
STRUCTURI CONJUNCTIVE **2 criterii din 6 = 2 puncte**	**STATUS BIOCHIMIC – CALCIU** **1 criteriu din 2 = 2 puncte**
1. Voce groasă, aspră 2. Gât lung sau umeri căzuţi 3. Hernie inghinală 4. Limitare articulară sau laxitate articulară 5. Diverticul al vezicii biliare sau intestinal 6. Prolaps rectal	1. Hipercalcemie 2. Hipercalciurie
Pentru diagnosticul pozitiv de sindrom Williams este necesar un scor mediu de 9 puncte.	

fost identificată prin citogenetică moleculară la 91-96% dintre pacienţii cu diagnostic clinic, existând cazuri cu origine maternă (39% din cazuri) sau paternă (61% din cazuri). De asemenea, este posibil diagnosticul molecular prin tehnica cantitativă PCR care atestă prezenţa unei singure alele pentru genele candidat (*ELN*, *LIMK1*, *GTF2I*) şi poate aprecia mărimea deleţiei după ce aceasta a fost confirmată prin tehnica FISH.

Evoluţie şi prognostic. Este obligatorie monitorizarea cardiovasculară anuală, în condiţiile în care stenozele, în special cele aortice şi renale, se pot agrava, necesitând rezolvare chirurgicală.

Pacienţii pot dezvolta complicaţii postanestezie, inclusiv moarte subită, necesitând un consult anterior detaliat. Monitorizarea tensiunii arteriale la ambele braţe se impune cel puţin o dată pe an, dar hipertensiunea răspunde bine la tratament medicamentos. Calcemia şi calciuria trebuie evaluate la 2 ani, mai ales că hipercalcemia creşte iritabilitatea şi induce stare de vomă, constipaţie şi crampe musculare. De obicei, calcemia poate fi modulată prin dietă, dar în cazurile refractare este necesară administrarea de steroizi pe cale orală. La copiii cu sindrom Williams-Beuren sunt contraindicate preparatele multivitaminice deoarece conţin vitamina D. Hiperopia şi strabismul trebuie corectate cu ochelari sau chirurgical. Otitele recurente necesită timpanotomie şi tub de dren. Tratamentul ortodontic trebuie aplicat pentru malocluzie. Medicaţia psihotropă poate avea efecte benefice în special pentru deficitul de atenţie. Evaluarea psihologică şi terapia psihiatrică pentru asistarea deficienţelor cognitive şi comportamentale trebuie individualizate pentru fiecare pacient. Adulţii trebuie evaluaţi în vederea unui posibil prolaps de valvă mitrală, insuficienţă aortică, stenoze arteriale şi trataţi corespunzător. De asemenea, este necesară monitorizarea deficitului auditiv, hipotiroidismului şi diabetului zaharat.

Etiopatogenie. Deleţia regiunii 7q11.23 este responsabilă de 90-95% din cazurile diagnosticate clinic şi nu există o asociere statistic semnificativă între trăsăturile clinice şi mărimea deleţiei, originea parentală a deleţiei şi sexul pacientului afectat. În ciuda unei frecvenţe uşor crescute a deleţiilor cromozomului

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

patern, nu există dovezi certe privind existența unui centru de amprentare la nivelul regiunii critice. Majoritatea pacienților au o deleție de 1,5 Mb, cauzată de recombinararea alelică neomologă între secvențe repetitive identice. Simptomatologia sindromului Williams-Beuren este atribuită haploinsuficienței mai multor gene din regiunea 7q11.23. Dacă hemizigoția genei *ELN* (elastină) participă în mod clar la realizarea manifestărilor cardio-vasculare, participarea altor gene candidat (*LIMK1*, *CYLN2* și *GTF21*) în realizarea manifestărilor neurologice este mai puțin evidentă. Celelalte gene din regiunea critică (*RFC2*, *STX1A*, *FZD9*, *FKBP6*) nu par a fi asociate cu modificările fenotipice.

Sfatul genetic. Microdeleția răspunzătoare de sindromul Williams-Beuren se transmite dominant autozomal. În majoritatea cazurilor microdeleția fiind *de novo* părinții nu sunt afectați și, în absența semnelor clinice, testarea acestora prin tehnica FISH nu este necesară.

Studii recente au demonstrat că aproximativ 30% dintre părinții normali ai pacienților cu sindrom Williams-Beuren au *o inversie care implică regiunea critică* și care ar favoriza recombinarea alelică neomologă, dar importanța practică a acestei inversii în sfatul genetic nu a fost elucidată. Dacă un părinte este afectat, riscul de recurență la alți descendenți este de 50%. Dacă părinții sunt neafectați, riscul de recurență la viitoarele sarcini este mai mic, de aproximativ 5%. Deși n-au fost citate cazuri de mozaicism germinal, diagnosticul prenatal trebuie aplicat la următoarele sarcini ale unui cuplu sănătos ce are un copil cu sindrom sindrom Williams-Beuren.

Diagnosticul prenatal prin tehnica FISH se poate efectua fie pe celule corionice în săptămânile 10-12 de gestație, fie pe amniocite în săptămânile 16-18.

B. Boli cromozomiale gonozomale

Anomaliile cromozomilor sexuali – numerice și structurale, omogene sau în mozaic, produc unele dintre cele mai frecvente boli genetice, a căror incidență globală este de 1 la 400 nou-născuți de sex masculin și 1 la 650 nou-născuți de sex feminin. Fenotipurile imprimate de aceste anomalii cromozomiale sunt, în general, mai puțin severe comparativ cu sindroamele autozomale datorită inactivării cromozomului X și numărului mic de gene de pe cromozomul Y, fenomene ce reduc consecințele dezechilibrului cromozomial. Dezvoltarea fizică și psihică sunt de obicei relativ puțin afectate; în schimb anomaliile cromozomilor sexuali produc în majoritatea cazurilor disgenezii gonadice și sterilitate. De aceea, orice întârziere în dezvoltarea pubertară, amenoreea primară sau cea secundară precoce, azoospermia și sterilitatea reprezintă indicații clinice importante pentru examenul cromozomial.

1. Sindromul Turner

Sindromul Turner este determinat de monosomia X, completă sau parțială, singura monosomie omogenă viabilă la specia umană.

Incidență. Boala afectează aproximativ 1/2.500-1/3.000 din nou-născuții de sex feminin, dar se estimează că aproximativ 2% din sarcinile evidente clinic prezintă monosomie X. Această monosomie este letală în 95% din cazuri în perioada embrionară și fetală (mortalitate prenatală mai mare decât cea observată în trisomiile 21, 18 și 13), embrionii fiind eliminați prin avorturi spontane.

Simptomatologie. În cazurile cu fenotip de sindrom Turner, diagnosticul clinic este posibil (în circa 2/3 din cazuri) la naștere sau înainte de pubertate, la vârste ce permit aplicarea unei terapii hormonale de supleere.

Diagnosticul clinic în *perioada neonatală* permite identificarea a 1/3 din cazuri, fiind susținut de următoarele semne evocatoare: copil de sex feminin, cu talie și greutate mai mică pentru o vârstă gestațională normală, limfedem dur, nedureros, tranzitoriu, localizat pe fața dorsală a mâinilor și picioarelor[22] – considerat „cheia diagnosticului" –, gât scurt, cu exces de piele pe ceafă și/sau *pterygium coli* (pliu cutanat pe fețele laterale ale gâtului) și distanță intermamelonară mare (figura 11.11).

O altă treime din cazuri pot fi identificate *prepubertar*. Suspiciunea clinică se bazează pe existența unei întârzieri majore de creștere, ce devine evidentă după 2-3 ani și atinge -3 DS față de medie la 10 ani. La aceasta se pot adăuga gât scurt, palmat, cu inserția joasă a părului pe ceafă și torace lat cu mameloane îndepărtate.

22. Reprezintă persistența unui limfedem generalizat apărut în viața fetală și vizibil uneori și sub formă de *hygroma colli cysticum* – o acumulare de lichid seros în dilatații limfatice ale regiunii cervicale.

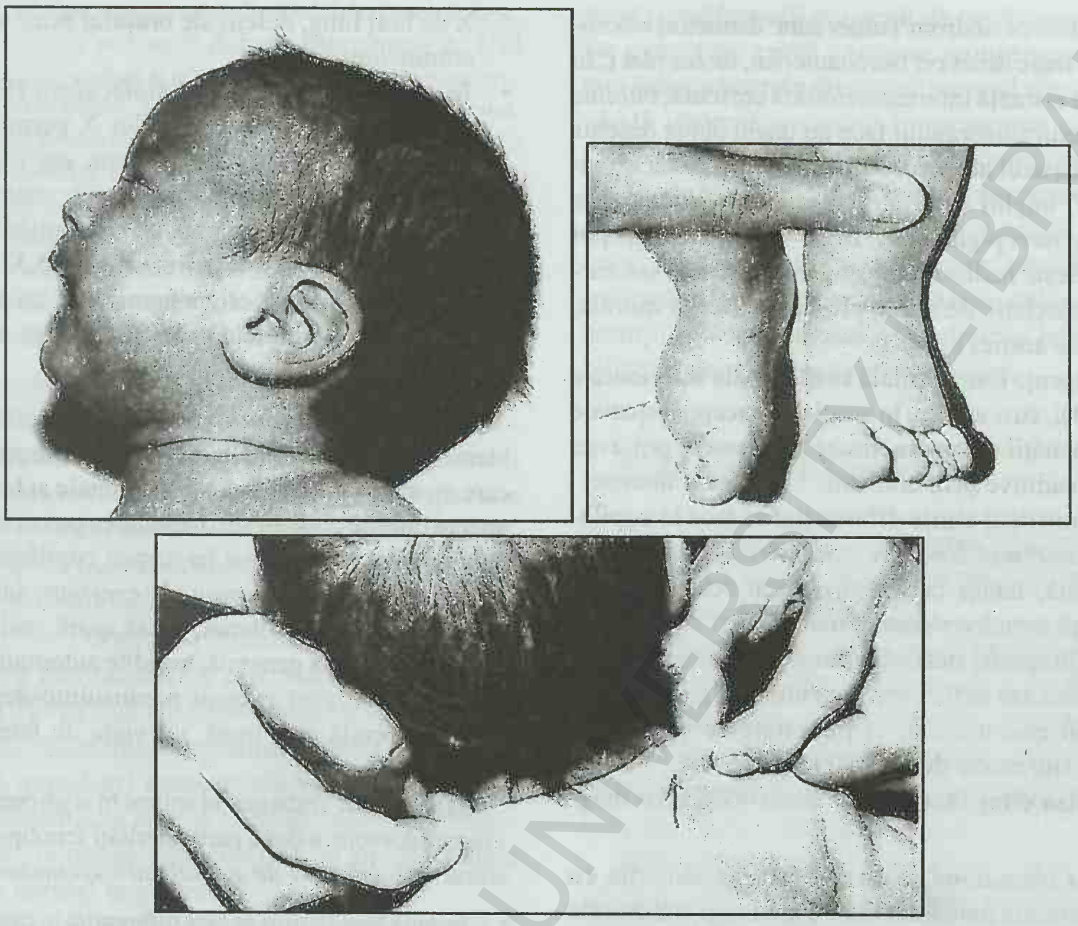


Figura 11.11. Aspect fenotipic caracteristic în sindromul Turner la nou-născut
(Colecția Centrului de genetică medicală Iași)

Postpubertar diagnosticul clinic este sugerat de triada: hipostatură, amenoree primară, caractere sexuale secundare feminine deficitare.

- Hipostatura este semnul cardinal al sindromului Turner. Deficitul creșterii staturale este prezent la peste 95% din cazuri, la jumătate dintre acestea debutul fiind prenatal. În absența tratamentului cu hormon de creștere, înălțimea pacientelor cu sindrom Turner se încadrează în intervalul 130-150 cm, dependent de talia părinților și de caracteristicile populaționale[23]; cu un tratament cu STH, inițiat înainte de 10 ani, se câștigă 6-10 cm la talia finală.
- Amenoreea primară și deficitul de sexualizare sunt secundare disgeneziei gonadice, produsă prin degenerescența ovocitelor (ce începe în viața fetală, după săptămâna 18) și înlocuirea parenchimului ovarian cu bandelete fibroase. Rareori, degenerescența este incompletă (mai ales la persoane cu monosomie X în mozaic), ceea ce conduce la o dezvoltare pubertară aproape normală și la apariția de cicluri ovulatorii neregulate; totuși, și la aceste cazuri, menopauza este precoce, iar probabilitatea de a avea o sarcină este infimă[24]. Deoarece ovarele disgenetice nu produc ovule, pacientele cu sindrom Turner au sterilitate primară și definitivă.
- Absența secreției hormonilor sexuali feminini (estrogeni și progesteron) induce amenoree primară, dezvoltare insuficientă a caracterelor sexuale secundare feminine (glande mamare puțin dezvoltate, pilozitate axilară absentă, pilozitate pubiană redusă) și creșterea FSH și LH. Organele genitale externe au aspect infantil, iar uterul este hipoplazic. Terapia de supleere cu estrogeni (începută prepubertar) corijează deficitul de sexualizare fenotipică.

În sindromul Turner există o dismorfie cranio-facială necaracteristică, exprimată prin: aspect matur al feței, facies triunghiular, epicantus, fante palpebrale antimongoloide, palat înalt, anomalii dentare, urechi proeminente. Alte semne ce pot fi identificate

23. În general, deficitul statural mediu este de –20 cm la talia finală.
24. Debutul spontan al pubertății a fost observat la circa 5% dintre pacientele cu monosomie X omogenă, 10-50% dintre pacientele cu anomalii structurale ale cromozomului X și 40-75% din cazurile cu mozaicuri cromozomiale.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

la pacientele cu sindrom Turner sunt: diametrul biacromial mai mare decât cel bitrohanterian, torace plat („în scut") cu distanță intermamelonară crescută, *cubitus valgus* (axul antebrațului face un unghi obtuz deschis în afară cu axul humerusului), scurtarea metacarpianului IV, unghii convexe hipoplazice, prezența a numeroși nevi pigmentari. În 30-40% din cazuri pot fi identificate malformații congenitale renale sau cardiace (coarctație de aortă, prolaps de valvă mitrală, bicuspidie aortică).

Inteligența este normală sau la limita inferioară a normalului, cu o scădere în special a percepției spațiale și a capacității de abstractizare. Pacientele pot avea deficite auditive prin anomalii ale urechii interne.

Diagnosticul clinic diferențial se face în copilărie cu *sindromul Noonan*, caracterizat clinic prin: hipostatură, facies caracteristic, gât scurt, palmat, deformații toracice/sternale, malformații congenitale de cord (în special stenoză pulmonară, cardiomiopatie hipertrofică sau defect septal ventricular), dar la care cariotipul este normal; la pubertate se vor lua în discuție alte cauze de întârziere pubertară.

Analiza citogenetică este decisivă pentru diagnostic.

- *Testul cromatinei X* este negativ în cazurile cu monosomie omogenă sau cu anomalii structurale ale cromozomului X în care locusul *XIST*, localizat în regiunea Xq12, este absent (deleții ale brațului lung, cromozomi în inel, izocromozomi X de braț scurt) și pozitiv, dar cu valori reduse, în cazul monosomiei în mozaic sau al monosomiilor parțiale în mozaic prin anomalii structurale. În prezența unor deleții sau a cromozomilor inelari X dimensiunea corpusculului Barr poate fi mai mică (aproximativ 0,7 μm) decât valoarea normală, în timp ce prezența unui izocromozom X de braț lung se asociază cu un corpuscul Barr mai mare (aproximativ 1,2 μm). Deși valoarea diagnostică a testului Barr este limitată, testul cromatinei X rămâne un test *screening* simplu și ieftin. Rezultatele sale trebuie însă validate prin cariotip.
- *Examenul cromozomial* este esențial pentru stabilirea diagnosticului de certitudine. În circa 50-60% din cazuri cariotipul evidențiază o monosomie X omogenă; în 25% din cazuri se întâlnesc diferite tipuri de mozaicuri[25], ce includ obligatoriu o linie cu monosomie X totală sau parțială (cel mai frecvent 45,X/46,XX – 15% cazuri – sau 45,X/46,XY); în restul cazurilor sunt identificate anomalii de structură ale cromozomului X[26]: izocromozomi X de braț lung, deleții ale brațului scurt sau lung, cromozomi inelari.
- *Tehnicile de citogenetică moleculară* (FISH) cu sonde specifice cromozomului X permit identificarea mozaicurilor în care una sau mai multe linii celulare sunt minoritare – sonde centromerice specifice cromozomilor X și Y permițând identificare mozaicurilor 45,X/46,XX sau 45,X/46,XY – sau caracterizarea cromozomilor X cu anomalii structurale – sondele specifice locilor *SHOX* și *XIST*.

Evoluție și prognostic. În perioada copilăriei probleme deosebite există la copiii cu sindrom Turner care au malformații cardiace sau renale și la care pot apărea diferite complicații. Depistarea precoce a bolnavelor permite instituirea în timpul copilăriei a unei terapii eficace cu *hormon de creștere*, iar prepubertar cu *estrogeni*. Ulterior, pot să apară, mai frecvent decât în populația generală, tiroidite autoimune, HTA, obezitate și diabet zaharat noninsulino-dependent. Inserția socială este bună, iar viața de familie este posibilă.

Tratament. Tratamentul aplicat în sindromul Turner vizează corecția a două particularități fenotipice: *hipostatura și deficitul de sexualizare secundară.*

- Terapia hipostaturii se face diferențiat în trei etape. În copilărie, se administrează hormon de creștere (STH). Tratamentul este cu atât mai eficace cu cât doza săptămânală este mai mare, debutul terapiei este mai precoce, iar perioada de aplicare este mai mare de 4 ani. Doza eficace este de 0,25-0,35 mg/kgc/săptămână, dar efecte benefice au fost obținute și cu doze mai mari de până la 0,48 mg/kgc/săptămână, cu condiția ca nivelul IGF-1 să nu depășească mai mult de +2DS. Principalele efecte secundare ale terapiei sunt insulinorezistența (dispare la întreruperea tratamentului) și modificările cardiovasculare (în special HTA). Tratamentul cu hormon de creștere are eficacitate până la maximum 14 ani, dar se preferă întreruperea lui în jurul vârstei de 11-12 ani când ritmul de creștere staturală corelat cu STH-ul începe să se diminueze. Studiile populaționale au indicat că terapia cu STH în sindromul Turner asigură o creștere medie a înălțimii finale de circa 7,5 cm. Cea de-a doua etapă de tratament se aplică între 11 și 12 ani și presupune administrarea unui androgen slab (de tipul oxandrolonului) pentru o perioadă de 18-24 luni. Ultima schemă terapeutică este bazată pe substituția estro-progestativă, care corectează concomitent și deficitul de sexualizare secundară.
- Corecția deficitului de sexualizare se face progresiv, începând cu vârsta de 13-14 ani. Se începe cu un

25. Analizele moleculare (FISH, PCR) au evidențiat o frecvență de 70% a mozaicurilor; datele trebuiesc însă a fi confirmate.
26. În cazul anomaliilor de structură, identificarea cromozomului inactivat, care este replicat tardiv în faza S, poate fi realizată prin tehnici de incorporare (BrdU, timidină tritiată).

estrogen (de preferat natural) administrat transdermic, percutan sau *per os*, în doze de aproximativ de 1/10 din nivelul normal al adultului. Doza se creşte progresiv la fiecare 6 luni, până se ajunge la nivelul adultului. Administrarea progesteronului se începe la 18-24 luni după debutul terapiei estrogenice şi se preferă un progesteron natural, a cărui doză este progresiv crescută timp de 1-2 ani. Administrarea terapiei estro-progestative creşte mineralizarea osoasă[27] şi favorizează o viaţă sexuală normală. Principalele efecte secundare sunt legate de perturbarea funcţiei hepatice.

Etiopatogenie. Studii recente au arătat că circa 2% dintre sarcinile recunoscute clinic prezintă monosomie X. Cauzele care determină lipsa frecventă a unui gonozom nu se cunosc. Eliminarea ca avorturi spontane a peste 95% din embrionii cu monosomie X se datorează probabil haploinsuficienţei unor gene importante de pe cromozomul X care scapă inactivării. Nu se cunoaşte încă explicaţia faptului că deşi letalitatea *in utero* a monosomiei X este mare, persoanele cu sindrom Turner supravieţuiesc mulţi ani fără probleme vitale deosebite. Ipoteza conform căreia majoritatea lor sunt mozaicuri cromozomiale nedetectate nu a fost confirmată; se pare că naşterea copiilor cu monosomie X omogenă este corelată cu prezenţa unui cariotip normal în placentă.

Dintre cazurile de nou-născuţi cu monosomie X omogenă, 50-70% au origine paternă, fiind consecinţa unei nedisjuncţii sau întârzieri anafazice în meioza tatălui ce duce la formarea de gameţi lipsiţi de gonozom.

Patogenia sindromului Turner este în curs de elucidare. Analizele moleculare au indicat că absenţa braţului scurt al cromozomului X determină hipostatura, probabil prin haploinsuficienţa genei *SHOX*[28], localizată în regiunea pseudoautozomală a braţului scurt al cromozomului X, deşi aneuploidia X *per se* poate genera sau participa la deficitul de creştere. Limfedemul congenital a fost asociat cu absenţa regiunii Xp11.4. În schimb, conservarea funcţiei ovariene este corelată cu prezenţa în dublu exemplar a locilor *POF1* (localizat în regiunea Xq26) şi *POF2* (localizat în regiunea Xq13-21.

Sfatul genetic. Riscul de recurenţă al sindromului Turner este uşor crescut în raport cu riscul existent în populaţia generală. Diagnosticul prenatal este posibil, fiind efectuat în condiţiile identificării de semne ecografice de alarmă: *hygroma cysticum, hidrops fetalis*, malformaţii congenitale cardiace sau renale. De asemenea, există cazuri de monosomie X depistate întâmplător prin diagnostic prenatal efectuat pentru vârstă maternă avansată în momentul concepţie. Oricum, depistarea unui fetus cu sindrom Turner ridică probleme etice majore privind continuarea sau întreruperea sarcinii. De regulă, doar în condiţiile depistării unor anomalii congenitale grave, neviabile, este indicată întreruperea sarcinii. Altfel, trebuie explicat părinţilor modul natural de evoluţie al bolii şi posibilităţile de tratament şi de urmărire.

2. Sindromul Klinefelter

Sindromul Klinefelter este consecinţa fenotipică a trisomiei XXY sau a altor polisomii XY; un fenotip asemănător au şi bărbaţii XX.

Incidenţă. Sindromul Klinefelter are o incidenţă medie de 1/500-1/700 nou-născuţi de sex masculin, dar multe cazuri nu sunt diagnosticate din cauza modificărilor fenotipice reduse. Reprezintă principala cauză de hipogonadism la bărbat şi este depistat la circa 11% din bărbaţii cu azoospermie.

Simptomatologie. Diagnosticul clinic al acestei afecţiuni este posibil doar postpubertar. În copilărie sindromul Klinefelter poate fi *suspectat* în prezenţa unei staturi înalte, a aspectului gracil şi a dificultăţilor de adaptare şcolară. La pubertate talia creşte (cu 6 cm peste medie), pe seama membrelor inferioare[29] cu habitus fie eunucoid, fie astenic. În general, diagnosticul *la adult* se face în caz de sterilitate cu azoospermie.

Prezenţa a cel puţin unui cromozom X suplimentar generează o disgenezie gonadică concretizată prin testicule mici (< 3 cm lungime x 1,5 cm lăţime, cu un volum < de 3ml), fermi, nedureroşi la palpare. Modificările histopatologic caracteristice sunt aplazia celulelor germinale, atrofia sau fibro-hialinizarea tubilor seminiferi şi hipertrofia celulelor Leydig cu fibroză interstiţială. Disgenezia determină un hipogonadism hipergonadotrop cu hipotestosteronemie asociată cu valori crescute ale hormonilor gonadotropi (FSH şi LH), iar postpubertar există variaţii ale spermogramei de la oligospermie la azoospermie.

În absenţa testosteronului, *caracterele sexuale secundare sunt slab dezvoltate*[30] : pilozitatea facială, axilară şi tronculară sunt absente, pilozitatea pubiană

27. Tratamentul estro-progestativ limitează efectele negative ale osteoporozei şi creşte vârsta de debut a acesteia.
28. Gena *SHOX* este una din genele implicate în dezvoltarea organismului.
29. Aspect determinat de închiderea târzie a cartilajelor de creştere în absenţa testosteronului.
30. Administrarea de hormoni sexuali masculini, cu scopul de inducere a dezvoltării caracterelor sexuale secundare masculine, are efecte benefice.

BCU MEDICINA UNIVERSITY LIBRARY

este redusă, corpul are conformație de tip feminin, vocea este înaltă, iar adipozitatea are o dispoziție de tip ginoid. Penisul se dezvoltă, de obicei, normal („*disociație peno-orhitică*") și funcția sexuală este normală. În circa 30% din cazuri apare ginecomastia (dezvoltarea glandelor mamare la un individ de sex masculin)[31] (figura 11.12).

Sterilitatea din sindromul Klinefelter este primară și definitivă. Rareori, la pacienții cu mozaic cromozomial, fertilitatea este păstrată, existând posibilitatea apariției de descendenți.

Dezvoltarea intelectuală este aproape normală, coeficientul intelectual fiind normal sau la limita inferioară a normalului, deși componenta verbală a coeficientului intelectual este, de regulă, deficitară. 70% din pacienții cu sindrom Klinefelter prezintă tulburări de învățare, determinate de dislexie. Deficitul intelectual este corelat cu prezența unui număr crescut de cromozomi X, fiecare cromozom X suplimentar scăzând, în medie, coeficientul intelectual cu 15 puncte. Inserția socială este de obicei dificilă, în condițiile în care pacienții cu sindrom Klinefelter au o personalitate timidă, liniștită și sensibilă.

Diagnosticul clinic diferențial se face în special cu sindromul Kallman care asociază hipogonadismul cu anosmia, cariotipul fiind 46,XY. De asemenea, la pacienții cu *hipogonadism hipergonadotrop și talie mică* trebuie luată în considerare suspiciunea clinică de bărbat 46,XX.

Analiza citogenetică stabilește diagnosticul de certitudine. Testul cromatinei sexuale X și testul cromatinei sexuale Y sunt pozitive. Cariotipul relevă în 85% din cazuri o trisomie 47,XXY liberă și omogenă. În circa 12-13% din cazuri sunt prezente diferite mozaicuri cromozomiale (cel mai frecvent: 46,XY/47,XXY). Cariotipurile 48,XXXY și 49,XXXXY sunt variante citogenetice rare[32], caracterizate prin accentuarea modificărilor dismorfice și reducerea intelectului. Rareori este identificat un cariotip 46,XX („bărbații XX", la care un mic segment al brațului scurt al cromozomului Y este translocat pe un cromozom X).

Evoluție și prognostic. Speranța de viață este normală. Pot apărea probleme de adaptare socială și tulburări de comportament. Dintre complicații pot fi enumerate: cancerul mamar (la cei cu ginecomastie), diabetul

a b

Figura 11.12. Sindromul Klinefelter: a) schiță de ginecomastie; b) disociație peno-orhitică la un băiat de 16 ani

(Colecția Centrului de genetică medicală Iași)

31. Ginecomastia este consecința secreției de către glandele suprarenale (în prezența nivelurilor crescute de FSH și LH) a unei cantități crescute de androgeni aromatizabili, transformați în ficat în estrogeni, care produc stimularea celulelor mamare. Apariția ginecomastiei este asociată cu un risc crescut de cancer mamar, persoanele cu sindrom Klinefelter reprezentând circa 3% din toate cazurile de cancer mamar la bărbat.
32. Incidența tetrasomiei XXXY este de 1/17.000-50.000, iar cea a pentasomiei XXXXY este de 1/85.000-100.000 de nou-născuți de sex masculin.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITARĂ

zaharat, hipotiroidismul, lupusul eritemetos, terenul varicos, osteoporoza.

Tratament. Principala terapie medicamentoasă constă în susbtituția androgenică ce trebuie începută de la pubertate, în jurul vârstei de 12 ani.

Se începe cu doze mici, care sunt crescute progresiv, până se atinge nivelul corespunzător bărbaților normali. Principalele efecte ale terapiei sunt normalizarea dezvoltării scheletice și a caracterelor sexuale secundare masculine. De asemenea, administrarea de testosteron îmbunătățește comportamentul, iar pe termen lung scade riscul de osteoporoză, de boli autoimune și de cancer mamar. Pentru ameliorarea performanțelor verbale este nevoie uneori de terapie logopedică.

Etiopatogenie. Sindromul Klinefelter este produs de trisomia XXY sau de polisomia XY. Aceste anomalii cromozomiale produc disgenezia testiculară, dar mecanismul prin care cromozomii X suplimentari determină acest efect este încă cunoscut. Trisomia XXY omogenă are în 60% din cazuri origine paternă (obligatoriu în meioza I) restul fiind de origine maternă (3/4 cazuri sunt produse de o nedisjuncție în meioza I). Formele în mozaic sunt postzigotice, secundare unei(or) nedisjuncții cromatidiene în mitozele unui embrion cu sex genetic masculin sau pierderii unui cromozom X la un zigot XXY.

Sfat genetic. Riscul de recurență nu este mai mare decât în populația generală, existând o asociere cu vârsta maternă în circa 30% din cazuri. Uneori, în cazul diagnosticului prenatal pentru varii motive, cariotipul relevă o formulă cromozomială 47,XXY. În condițiile în care fenotipul de sindrom Klinefelter nu se asociază cu complicații letale, întreruperea sarcinii este contraindicată, iar familiei trebuie să îi fie explicată evoluția bolii și posibilitățile de tratament.

3. Trisomia X și alte polisomii X

Trisomia X sau sindromul triplo X afectează 1/1.000 de nou-născuți de sex feminin și nu produce modificări fenotipice caracteristice, astfel încât doar 10% din cazuri sunt diagnosticate clinic. Polisomiile X sunt mai rare.

Diagnosticul clinic este de regulă dificil, datorită absenței semnelor caracteristice. Depistarea neonatală este de obicei întâmplătoare, fie în condițiile în care se efectuează cariotipul datorită hipotoniei neonatale, fie pentru că, prin diagnostic prenatal, a fost identificată o formulă cromozomială cu 3 cromozomi X.

În copilărie există o accelerare a ritmului creșterii, identificată la o pacientă cu dismorfie facială necaracteristică (epicantus, hipertelorism, fante palpebrale monogoloide) și care poate prezenta crize comițiale. Uneori se observă dificultăți de învățare, deficiențe motorii și în achiziția limbajului.

La adult sunt caracteristice talia înaltă (75-80% din cazuri) cu membre inferioare lungi. De regulă, dezvoltarea pubertară este normală, dar există posibilitatea apariției tulburărilor menstruale (cicluri neregulate, menopauză precoce) și de reproducere (sterilitate sau avorturi spontane repetate). În majoritatea cazurilor, femeile sunt fertile, putând avea copii normali sau copii cu trisomie X sau trisomie XXY, dar riscul de aneuploidie la descendenți nu este mai mare de 5%. De asemenea, pot există tulburări psihotice sau depresie.

La pacientele cu polisomii X intelectul este mult mai sever afectat și de obicei există manifestări dismorfice și sterilitate.

Explorările citogenetice precizează diagnosticul. Cromatina X este pozitivă, fiind evidențiate celule cu unul sau doi corpusculi Barr[33]. Cariotipul poate releva o trisomie X omogenă sau în mozaic. La circa 10% din cazuri este detectat un mozaic de tipul 46,XX/47,XXX sau 47,XXX/45,X. Rareori, cariotipul poate releva o polisomie X (tetra- sau pentasomie) uneori fiind depistate mozaicuri complexe ce conțin și linii normale, cu monosomie X sau trisomie X.

Originea cromozomului X suplimentar este în majoritatea cazurilor maternă, provenind dintr-o nedisjuncție în meioza I (aproximativ 65% din cazuri), în meioza II (aproximativ 17-18%) sau, respectiv, primele mitoze ale embrionului (circa 17-18%). În toate aceste cazuri există o asociere între vârsta maternă avansată în momentul concepției și apariția trisomiei X la copil, riscul fiind de circa 1/2.500 de nașteri la 33 de ani și de 1/450 de nașteri la 43 de ani.

O problemă de sfat genetic o reprezintă cazurile de trisomie X depistate fortuit printr-una din tehnicile de diagnostic prenatal. În condițiile în care viabilitatea persoanelor cu trisomie X este cvasinormală și evoluția nu este marcată de complicații majore, nu există indicație de întrerupere a sarcinii. Astfel, este nevoie a se explica părinților modul de evoluție a bolii și care sunt metodele de ameliorare a calității vieții pacientelor cu trisomie X. În plus, după naștere este nevoie a se repeta cariotipul pentru a fi depistate eventuale mozaicuri, care pot genera complicații.

33. La cazurile cu polisomii X pot fi depistați și mai mult de 2 corpusculi Barr.

4. Sindromul 47,XYY

Trisomia XYY este relativ frecventă, dar diagnosticul clinic este rareori stabilit datorită modificărilor fenotipice minore pe care le determină. Incidența afecțiunii este de 1/1.000 de nou-născuți de sex masculin.

Fenotipul se caracterizează prin talie înaltă[34], dezvoltare intelectuală normală, dar coeficientul de inteligență este cu 10-15 puncte mai mic decât cel al persoanelor înrudite. Pacienții pot prezenta întârziere în dezvoltarea limbajului, dificultăți de învățare (prin dificultăți de citire și deficit de atenție), probleme educaționale, hiperactivitate și impulsivitate (agresivitatea și comportamentul aberant, descrise inițial în literatură, sunt rare). Comparativ cu modificările cognitive din sindromul Klinefelter, trisomia XYY se caracterizează printr-un fenotip mai puțin grav.

Diagnosticul se pune numai prin analize citogenetice: cariotipul este 47,XYY, testul cromatinei Y pozitiv, evidențiind prezența a doi corpusculi F, iar analiza FISH cu sonde specifice cromozomului Y identificând cromozomul suplimentar ca fiind un cromozom Y. Trisomia XYY omogenă a fost depistată în aproximativ 90% din cazuri, în restul cazurilor fiind identificate mozaicuri, cel mai frecvent de tip 46,XY/47,XYY și mai rar 47,XYY/48,XXYY. Toate cazurile sunt consecința unei nedisjuncții în meioza II paternă.

De regulă persoanele cu trisomie XYY au fertilitate normală, dar uneori pot fi depistate tulburări de spermatogeneză, care induc hipofertilitate. Deși, teoretic pot forma gameți anormali, riscul unor descendenți XXY sau XXX nu este mai mare decât în populația generală. Diagnosticul prenatal este de obicei întâmplător, dar evidențierea unui făt 47,XYY poate genera dileme etice referitoare la păstrarea sau întreruperea sarcinii.

C. Tulburările de reproducere de cauză cromozomială

Tulburările de reproducere sunt reprezentate de sterilitate (incapacitatea de a concepe) și infertilitate (incapacitatea de menține o sarcină și a da naștere unui copil viu)[35]. Circa 10% dintre cuplurile tinere au sterilitate ce afectează în proporții egale bărbatul și femeia. În plus, 15-20% din sarcinile recunoscute clinic se încheie prin avorturi spontane, în timp ce 1% din cupluri prezintă avorturi repetate. Prevalența nou-născuților morți este de 6,5-7 la 1.000 nou-născuți vii. Ținând cont de aceste frecvențe este evident că tulburările de reproducere sunt o problemă medicală frecventă și importantă.

Cauzele tulburărilor de reproducere sunt multiple: genetice, malformative, endocrine, imunologice sau ecologice. Ponderea factorilor genetici este semnificativă, astfel încât abordarea medicală implică acțiuni complexe din care nu poate lipsi investigarea clinică și paraclinică genetică.

1. Sterilitatea feminină

Sterilitatea la femei poate avea cauze multiple (tabelul 11.8): disgenezie sau disfuncție ovariană (40%), obstrucție tubară (40%) și anomalii sau boli ce afectează tractul reproductiv (vagin, cervix, uter) (20%). Unele dintre acestea se asociază cu amenoree primară sau amenoree secundară precoce (caseta 11.1).

Anomaliile cromozomiale care afectează structura și funcția ovariană sunt reprezentate în primul rând de monosomia X (inclusiv disgenezia gonadică mixtă 45,X/46,XY) și, mai rar, de alte aneuploidii (unele cazuri de trisomie X sau polisomie X), deleții sau translocații X-autozom. Regiunile critice corelate cu disgenezia ovariană sunt POF1, localizată în Xq26-q28, și POF2, localizată în Xq13.3-q22, regiuni în care se găsesc probabil gene necesare dezvoltării normale a ovarelor (de exemplu, gena *DIAPH2* în regiunea POF2). Alte boli genetice și anomalii congenitale menționate în tabelul 11.8 au un determinism monogenic sau multifactorial.

2. Sterilitatea masculină

Cauzele sterilității masculine (tabel 11.9) sunt reprezentate, în ordinea frecvenței, de către varicocel (dilatații anormale ale venelor cordonului spermatic ce pot comprima canalele deferente) (40%), disgenezie testiculară (14%), tulburări endocrine (9%), diferite alte obstrucții ale canalelor deferente (8%), testiculi necoborâți congenital (criptorhidie, 4%), inflamații.

Cauzele genetice sunt relativ frecvente în sterilitatea masculină. Anomaliile cromozomiale constituționale sunt decelate la 15% dintre subiecții cu

34. Talia înaltă a fost asociată cu prezența a 3 alele ale genei *SHOX*: una pe cromozomul X și două pe cei doi cromozomi Y.
35. În literatura medicală anglosaxonă se folosește global termenul de *infertility* – infertilitate – atât pentru sterilitate, cât și pentru alte tulburări reproductive, precum avorturile spontane sau nașterea de copii cu malformații vii sau morți.

Tabel 11.8. Cauzele de sterilitate la femei
(după Williamson şi Ellias, 1992)

Categorie	Exemple de boli mai frecvente	Manifestări
Disgenezie ovariană		
Anomalii cromozomiale	Sindrom Turner (45,X)	Talie mică, gât palmat, caractere sexuale secundare reduse, amenoree primară
Boli monogenice	Disgenezie gonadică pură 46,XX	Disgenezie ovariană izolată cu sau fără surditate
Disfuncţie ovariană		
Tulburări în sinteza hormonilor sexuali	Hiperplazia congenitală suprarenală	Exces de androgeni; deficit de cortizol şi aldosteron
Ovare displazice	Sindromul Stein-Leventhal	Ovare polichistice, hirsutism
Alte boli endocrine	Deficienţă hipofizară	Deficienţă în sinteza FSH, LH
Boli sistemice, afecţiuni cronice	Disfuncţie cerebrală, infecţii autoimunitate	Perturbarea stimulării hipofizare a ovarelor
Anomalii ale tractului reproductiv		
Uterine	Uter bicorn, bipartit	Modificarea anatomiei uterine
	Sindroame plurimalformative	
	Sindromul McKusick/Kaufman	Anomalii cardiace, renale, digitale
	Asociaţia MURCS	Anomalii uterine, renale, ale coloanei cervicale
	Secvenţa Rokitansky	Anomalii uterine, renale
Col uterin, vagin	Aplazie cervix, vagin septat	Anomalii cervix sau vaginale
Inflamaţii ale tractului reproductiv		
Infecţii	Gonoree, sifilis, chlamidia	Obstrucţie tubară
Endometrioze	Ţesut endometrial în afara uterului	Menstruaţii anormale, dureri pelvine

CASETA 11.1

Amenoreea primară şi amenoreea secundară

Amenoreea sau absenţa menstruaţiei este un semn clinic care se manifestă postpubertar, fiind primară sau secundară. Amenoreea primară (AP) este definită ca absenţa menarhei până la vârsta de 14 ani la fete cu absenţa caracterelor sexuale secundare sau până la 16 ani la fete cu caractere sexuale secundare normal dezvoltate; AP afectează 0,1-2,5% dintre fete. Amenoreea secundară (AS) este mai frecventă ca AP (1-5% dintre femeile de vârstă reproductivă) şi este definită prin absenţa ciclurilor menstruale cel puţin şase luni, în absenţa sarcinii, la femei cu menstruaţii regulate anterior sau 12 luni la femei cu cicluri neregulate anterior.

Cauzele majore ale AP sunt disgeneziile ovariene (50%), disfuncţiile hipotalamo-hipofizare (28%) şi anomaliile tractului reproductiv feminin (22%). Disgeneziile ovariene sunt determinate de anomalii de număr ale cromozomului X (cel mai frecvent 45,X omogene sau în mozaic şi mai rar 47,XXX) sau anomalii de structură: izocromozomi sau deleţii (Xq sau Xp) şi translocaţii X-autozomi; mai rar se întâlnesc mutaţii genice (disgenezia gonadică pură 46,XX; disgenezia gonadică completă 46,XY; disgenezia gonadică mixtă 45,X/46,XY; sindromul de insensibilitate completă la androgeni – CAIS). Cauzele AS sunt reprezentate de afecţiuni ovariene (40%), disfuncţii hipotalame (34%) sau hipofizare (19%), anomalii uterine (5%) şi alte cauze (infecţioase, autoimune, medicamentoase) (1%).

În orice caz de amenoree primară sau secundară precoce evaluările clinice şi hormonale vor fi dublate de consult şi explorări genetice pentru a se stabili cât mai precis posibil etiologia amenoreei şi managementul corect al pacientei.

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 11.9. Cauzele de sterilitate la bărbați
(după Williamson și Ellias, 1992)

Categorie	Boli	Manifestări
Disgenezie testiculară		
Anomalii cromozomiale	Sindrom Klinefelter (47,XXY)	Talie înaltă, caractere sexuale secundare reduse, testiculi mici
Pseudohermafroditism masculin	Disgenezie gonadică 46,XY (prin mutații ale genei SRY)	OGE feminine, derivate mulleriene prezente, gonade disgenetice
	Testicul feminizant (CAIS – *Complete androgene insensibility syndrome*)	Fenotip feminin, deficit al receptorilor pentru androgeni, testicule prezenți labial sau inghinal
Anomalii congenitale	Unele sindroame cromozomiale și mendeliene	Criptorhidism, micropenis, spermatogeneză anormală
Disfuncție testiculară		
Tulburări în sinteza/acțiunea hormonilor sexuali	Sindromul Reifenstein (PAIS – *Partial androgene insensibility syndrome*)	Deficit parțial de receptori de androgeni
	Hipoplazie congenitale suprarenală	Deficit de androgeni, deficit de cortizol, aldosteron
Alte anomalii endocrine	Sindromul Kallman	Disfuncție hipofizară, anosmie
Anomalii congenitale	Testicul necoborât congenital	Blocarea spermatogenezei
	Sindromul Kartagener	Azoospermie, dilatații bronșice, situs inversus
Spermatogeneză anormală	Anomalii cromozomiale structurale echilibrate	Oligo(azoo)spermie
	Microdelеții de Yq	
Anomalii ale tractului reproductiv		
Canale deferente	Varicocel	Dilatații varicoase ale venelor cordonului spermatic
	Fibroză chistică	Absența canalelor deferente, afectare pulmonară și gastro-intestinală
	Unele sindroame malformative	
Uretră	Sindromul McKusick-Kauffman	Anomalii cardiace, renale, digitale
Inflamații ale tractului reproductiv		
Infecții	Gonoree, sifilis, chlamidia, TBC	Obstrucție canale deferente

azoospermie și la 6% dintre subiecții cu oligospermie severă (<10 milioane spermatozoizi/ml). Alte sindroame sau malformații ce afectează structura testiculară sau căile genitale au un determinism monogenic sau multifactorial.

Anomaliile cromozomiale numerice care afectează structura și funcția testiculară sunt reprezentate în special de sindromul Klinefelter (47,XXY). Bărbații prezintă azoospermie, iar biopsia testiculară relevă atrezia celulelor germinale, sclerohialinizarea tubilor seminiferi și atrofia celulelor Leydig. Mecanismul prin care trisomia XXY produce aceste modificări nu este complet cunoscut, dar poate fi implicat un efect de dozaj genic, indus de prezența a doi cromozomi X. Singurele trisomii autozomale care pot ajunge la vârsta reproductivă sunt trisomia 21 și trisomia 8 în mozaic, ambele fiind asociate cu sterilitate masculină. Un rol aparte în determinismul sterilității la bărbat îl au anomaliile structurale neechilibrate ale cromozomului Y și anomaliile structurale echilibrate ale autozomilor.

Anomaliile neechilibrate ale cromozomului Y nu modifică fenotipul, deoarece acest cromozom conține foarte puține gene implicate în dezvoltarea somatică. În schimb, aceste anomalii afectează testiculii, datorită absenței uneia sau mai multor regiuni ale cromozomului Y, regiuni implicate în determinismul sexual și/sau controlul spermatogenezei. Cele mai frecvente anomalii sunt microdelețiile Yq. Majoritatea sunt *de novo* și au fost identificate la 3-18% dintre bărbații cu azoospermie neobstructivă și la 5-10% dintre bărbații cu oligospermie severă. Evidențierea microdelețiilor cromozomului Y poate fi realizată prin tehnica de PCR cantitativă.

Prezența unei microdelеții a cromozomului Y determină modificări anatomopatologice testiculare, care variază de la absența completă a celulelor germinale (*Sertoli cell-only syndrome* – SCOS) până la blocarea

spermatogenezei. Analizele moleculare au relevat că regiunea critică în microdeleţiile cromozomului Y este localizată la nivelul benzii Yq11.23 şi a fost denumită AZF (*AZoospermia Factor*) (figura 11.13). Regiunea AZF a fost împărţită în trei domenii notate: AZFa, AZFb şi AZFc. Deleţiile subregiunii AZFa sunt rare (1-5%), dar severe, fiind asociate cu SCOS. Studiile moleculare au arătat că genele cel mai probabil implicate sunt *USP9Y* şi *DBY*. Deleţiile AZFb (16%) şi AZFc (60%) sunt mai frecvente, fiind asociate cu blocarea spermatogenezei. La nivelul regiunii AZFb a fost identificată gena *RBMY* care face parte dintr-un complex multigenic de 20-50 gene/pseudogene. La nivelul regiunii AZFc a fost identificată gena *DAZ*. Aceasta este prezentă în 4-6 copii, codifică o proteină care se fixează pe ARN şi este exprimată doar în celulele germinale testiculare.

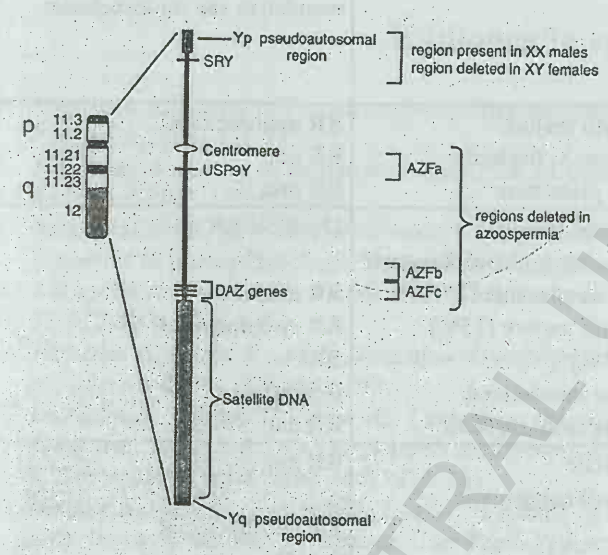


Figura 11.13. Cromosomul Y: regiuni şi gene implicate în determinismul sexelor şi azoospermie
(după Thompson & Thompson, 2004)

Anomaliile cromozomiale structurale echilibrate, reprezentate de inversii, translocaţii (reciproce, Robertsoniene) şi inserţii produc sterilitate masculină prin afectarea formării veziculei sexuale, ca urmare a prezenţei cromozomului(ilor) derivativ(i).

Inversiile cromozomilor 1, 2, 3, 5, 6, 7 şi 9 au fost asociate cu sterilitatea masculină, incidenţa lor fiind de 8 ori mai mare decât la persoanele normale.

Translocaţiile reciproce şi inserţiile se întâlnesc în 1% din sterilităţile masculine producând blocarea spermatogenezei prin modificarea configuraţiei meiotice normale. Translocaţiile Robertsoniene dintre cromozomii acrocentrici sunt implicate în circa 0,7% dintre cazurile cu sterilitate masculină, cea mai frecventă fiind translocaţia rob(13;14). Afectarea fertilităţii este însă variabilă: de la o spermatogeneză cvasinormală până la blocarea aproape completă a spermatogenezei. Acest aspect este dovedit de existenţa unor cazuri familiale, în care diferiţi membri ai aceleaşi familii, purtători de translocaţie, sunt unii sterili, unii cu hipofertilitate, iar alţii cu o fertilitate normală.

Datele prezentate arată clar necesitatea explorării citogenetice a oricărui bărbat cu spermogramă anormală la care o etiologie infecţioasă este eliminată. Totuşi, nu trebuie uitat (vezi capitolul 6.C.3) că 1 din 232 nou-născuţi are o anomalie cromozomială echilibrată care poate produce o tulburare de reproducere.

3. Avorturile spontane şi nou-născuţii morţi

În 15-20% din sarcini produsul de concepţie poate fi eliminat sub forma unui avort spontan (în primele 20 săptămâni de sarcină) sau a unui nou-născut mort (după săptămâna 20); avorturile se subîmpart în precoce (0-8 săptămâni) şi tardive (9-20 săptămâni).

Avorturile spontane (AS) reprezintă pierderea inexplicabilă a unei sarcini, înainte de a 20-a săptămână de gestaţie, a unui făt cu greutatea sub 500 grame, înainte ca acesta să fie capabil să supravieţuiască în mediul extrauterin.

Moartea fetală intrauterină reprezintă moartea *in utero* a unui făt cu vârsta gestaţională mai mare de 20 de săptămâni, greutate mai mare de 500 grame şi lungimea corpului mai mare de 25 de centimetri (măsurată din vertex-călcâi).

Etiologia pierderilor de sarcină este complexă, implicând factori genetici, malformativi, endocrini, placentari, materni, imunologici[36] (tabelul 11.10). Anomaliile cromozomiale fetale au o pondere variabilă, dar întotdeauna importantă.

Numeroase studii au arătat că *avorturile spontane precoce* (AP) implică, în peste 50% din cazuri, eliminarea unui embrion cu anomalii cromozomiale. Frecvenţa anomaliilor cromozomiale depinde de morfologia avortonului. Din acest punct de vedere Kalousek (1997) deosebeşte trei categorii:

- AP cu creştere dezorganizată (58-70% din toate AP) au o incidenţă mai mare a anomaliilor cromozomiale;
- AP cu morfologie normală sunt produse mai ales de anomalii de fază luteală sau anomalii uterine;
- AP cu defecte focale au un procent mare de anomalii cromozomiale, deşi atunci când se observă malformaţii unice trebuie invocat mai ales un determinism multifactorial.

36. Avorturile spontane au fost asociate cu titruri crescute ale anticorpilor antifosfolipidici, anticardiolipinici, anti-TPO ş.a.

Tabel 11.10. Tipuri de pierderi de sarcină
(după Kalousek, 1997)

Tip (morfologie, frecvență)	An.Crz. (%)	Etiologie	Implicații
Avorturi spontane precoce (AP) (0-8 săptămâni)	50		De obicei RR scăzut
Creștere dezorganizată (GD) (58-70% din AP)			
GD1 (sac, fără embrion)	60	Trisomii (27%)	Studiul cromozomilor parentali când sunt ≥ 3 AP sau atunci când embrionul are o anomalie de structură.
GD2 (embrion, fără RP)	73	Poliploidii (10%)	
GD3 (embrion, RP)	52	Monosomii X (9%)	
GD4 (embrion, disproporții)	37	Rearanjări (2%)	
Morfologie normală (16-34% AP)	20	Defect de fază luteală Anomalii uterine	RR scăzut
Defecte focale (5-18% din AP) defecte de tub neural, anomalii ale membrelor, despicături palatine	92	Monosomie X, Triploidie, Trisomii	În cazul în care cariotipul este normal este posibil un RR mendelian sau multifactorial
Avorturi spontane tardive (9-20 săptămâni)	4-7	Malformații majore Monosomie X, triploidie Anomalii placentare	RR multifactorial RR mic RR mic
Nou născuți morți (>20 săptămâni)	5-10	Boli materne (40%) (+abuz nicotină, alcool, droguri) Dezlipire de placentă (15%) Malformații majore (15%) IUGR (11%) Sindroame mendeliene Sindroame cromozomiale	Deobicei RR mic RR scăzut RR multifactorial 0-50% 0-50% RR mic
Decese neonatale (0-4 săptămâni după naștere)	2-5	Prematuritate Malformații congenitale unice sindroame Infecții (produc corioamniotite) Boli materne Hidrops fetal	RR mic RR multifactorial 0-50% RR mic RR mic 0-50%

AP – avort precoce; RP – pigment retinian („ochi"); An.Crz. – anomalii cromozomiale; RR – risc de recurență pentru făt anormal și/sau avort

Avorturile tardive, produse după săptămâna 9 de sarcină, sunt cauzate doar în 4-7% din cazuri de anomalii cromozomiale, de obicei monosomie X, triploidii și trisomii autozomale comune. Triploidiile se asociază cu anomalii placentare (vilozitățile coriale devin chistice) de tip *molă hidatiformă completă sau parțială*.

La produșii de avort au fost identificate toate tipurile de anomalii cromozomiale neechilibrate, care în ordinea frecvenței sunt: trisomii, poliploidii, monosomia X, anomalii structurale neechilibrate (microdelеții)[37]. Studiile efectuate pe produși de avort au relevat prezența tuturor trisomiilor, dar cea mai frecventă este trisomia 16.

Avorturile repetate (recurente) (≥ 2 sarcini consecutive) au fost identificate la 1-5% din cupluri, cauzele genetice (anomalii cromozomiale, de obicei structurale neechilibrate, și boli monogenice letale) situându-se pe locul trei după boli endocrine și malformații sau boli uterine. Translocațiile neechilibrate (5-6% din avorturile recurente) pot fi consecința malsegregării unei translocații echilibrate la unul din părinți; în această situație, probabilitățile de finalizare ale unei sarcini la o femeie purtătoare fiind: 80%

37. Analiza cromozomială convențională este dificilă datorită eșecurilor de cultură celulară. Recent a fost înlocuită cu folosirea CGH pe microrețele care are avantajul identificării unui procent mai mare de microdelеții.

BCU IAȘI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

avort, 4% nou-născut malformat, 16% nou-născut normal. În situația în care părinții au formule cromozomiale normale riscurile empirice de recurență sunt: 24% după două avorturi spontane consecutive și 36% după trei avorturi. Totuși, probabilitatea de a finaliza o sarcină prin nașterea unui copil este mai mare de 60%.

Terminarea unei sarcini prin nașterea unui copil mort poate fi determinată de cauze multiple și variate: boli materne (inclusiv consumul de nicotină, alcool, droguri), IUGR[38] (ca urmare a anomaliilor placentare, infecțiilor fetale, sindroamelor genetice), malformații majore, sindroame mendeliene, sindroame cromozomiale (5-10%), decolare de placentă.

Orice pierdere a unei sarcini dorite este un eveniment traumatizant, care necesită un sprijin psihologic atent. Întrebările cu care se confruntă medicul sunt: *„De ce s-a produs?"* și *„Ce risc există la sarcinile următoare?"*, iar obținerea de răspunsuri adecvate poate fi asigurată de analiza aprofundată a cauzelor de către o echipă specializată și aplicarea unor teste de laborator performante. Cert este că intervenția factorilor genetici este importantă și, în funcție de determinismul monogenic, multifactorial sau cromozomial, riscurile variază de la 50% la 3% (tabelul 11.10). La orice cuplu confruntat cu mai multe pierderi de sarcină (avorturi și/sau nou-născuți morți) se va face analiza cromozomială, chiar dacă numai la 2-5% din aceste cupluri, unul din parteneri are o anomalie cromozomială echilibrată.

Bibliografie specifică selectivă

1. American Academy of Pediatrics Committee on Genetics. *Health supervision for children with Turner syndrome.* Pediatrics 2003; 111:692-702.
2. American Academy of Pediatrics Committee on Genetics. *Health supervision for children with Down syndrome.* Pediatrics 2001;107:442-449.
3. Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S. *Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology.* Nature Rev Genet 2004; 5:725-738.
4. Antonelli A, Gandini L, Petrinelli P. *Chromosomal alterations and male infertility.* J Endocrino Invest 2000; 23:677-683.
5. Battaglia A, Carey JC. *Wolf–Hirschhorn syndrome and the 4p-related syndromes.* Am J Med Genet Part C Semin Med Genet 2008; 148C:241-243.
6. Battaglia A, Filippi T, Carey JC. *Update on the clinical features and natural history of Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome: Experience with 87 patients and recommendations for routine health supervision.* Am J Med Genet Part C Semin Med Genet 2008; 148C:246-251.
7. Baum RA, Nash PL, Foster JEA, Spader M, Ratliff-Schaub K, Coury DL. *Primary Care of Children and Adolescents with Down Syndrome: An Update.* Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care 2008; 38:241-261.
8. Bejjani BA, Shaffer LG. *Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics.* Annual Rev Hum Genet 2008; 9:71-86.
9. Bolar K, Hoffman AR, Maneatis T, Lippe B. *Long-Term Safety of Recombinant Human Growth Hormone in Turner Syndrome.* J Clin Endocrinol Metab 2008; 93:344-351.
10. Branch DW, Gibson M, Silver RM. *Recurrent miscarriage.* N Engl J Med 2010; 363:1740-1747.
11. Bray I, Wright DE, Davies C, Hook EB. *Joint estimation of Down syndrome risk and ascertainment rates: A meta-analysis of nine published data sets.* Prenatal Diag 1998; 18:9-20.
12. Cassidy SB, Driscoll DJ. *Prader–Willi syndrome.* Eur J Hum Genet 2009; 17:3-13.
13. Cassidy SB, Allanson JE. *Management of Genetic Syndromes.* ed. a II-a. Wiley-Liss, New York, 2005, 429-448.
14. Cerruti Mainardi P. *Cri du Chat syndrome.* Orphanet J Rare Dis 2006; 1:33.
15. Emanuel BS. *Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements.* Dev Disabil Res Rev 2008; 14:11-18.
16. Ferlin A, Arredi B, Foresta C. *Genetic causes of male infertility.* Reprod Toxicol 2006; 22: 133-141.
17. Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A, Foresta C. *Molecular and Clinical Characterization of Y Chromosome Microdeletions in Infertile Men: A 10-Year Experience in Italy.* J Clin Endocrinol Metabol 2007; 92:762-770.
18. Goldstone AP, Holland AJ, Hauffa BP, Hokken-Koelega AC, Tauber M. *Recommendations for the Diagnosis and Management of Prader-Willi Syndrome.* J Clin Endocrinol Metab 2008; 93:4183-4197.
19. Gravholt CH, Stochholm K. *The epidemiology of Turner syndrome.* International Congress Series 1298 (2006) 139-145.
20. Greene AK, Kim S, Rogers GF, Fishman SJ, Olsen BR, Mulliken JB. *Risk of Vascular Anomalies With Down Syndrome.* Pediatrics 2008; 121:e135-e140.

38. IUGR – *IntraUterine Growth Retardation* – întârziere de creștere intrauterină.

21. Hjerrild B, Mortensen KH, Gravholt CH. *Turner syndrome and clinical treatment*. Br Med Bull 2008; 86:77-93.
22. Kalousek DK. *Pathology of abortion: the embryo and the previabil fetus*. În Gilbert-Barnes E (ed.). *Potter's Pathology of the fetus and infant*. Mosby, StLouis, 1997, 106-128.
23. Kesler SR. *Turner Syndrome*. Child Adolesc Psychiatr Clin N Am 2007; 16:709-722.
24. Kobrynski LJ, Sullivan KE. *Velo-cardio-facial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes*. Lancet 2007; 370:1443-1452.
25. Kronenberg A, Melmed S, Polansky K, Reed Larsen P. *Williams Textbook of Endocrinology*. ed. a XI-a. Saunders-Elsevier, Philadelphia, 2008, 1012-1120.
26. Linsday EA. *Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome*. Nat Rev Genet 2001; 2:858-868.
27. Maas NMC, Van Buggenhout G, Hannes F, Thienpont B, Sanlaville D, Kok K, Midro A, Andrieux J, Anderlid BM, Schoumans J, Hordijk R, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR. *Genotype-phenotype correlation in 21 patients with Wolf-Hirschhorn syndrome using high-resolution array CGH*. J Med Genet 2008; 45:71-80
28. Otter M, Schrander-Stumpel CTRM, Curfs LMG. *Triple X syndrome: a review of the literature*. Eur J Hum Genet 2010; 18:265-271.
29. Patterson D. *Molecular genetic analysis of Down syndrome*. Hum Genet 2009; 126:195-214.
30. Pober BR. *Williams-Beuren syndrom*. N Engl J Med 2010; 362:239-252.
31. Rodriguez-Caballero A, Torres-Lagares D, Rodriguez-Perez A, Serrera-Figallo MA, Hernández-Guisado JM, Machuca--Portillo G. *Cri du chat syndrome: A critical review*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2010(1); 15(3):e473-478.
32. Schubert C. *The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome*. Cell Mol Life Sci 2009; 66:1178-1197.
33. Shprintzen RJ. *Velo-cardio-facial syndrome: 30 Years of study*. Dev Disabil Res Rev 2008; 14:3-10.
34. Stochholm K, Juul S, Gravholt CH. *Diagnosis and mortality in 47,XYY persons: a registry study*. Orphanet Journal of Rare Diseases 2010; 5:15.
35. Tartaglia NR, Howell S, Sutherland A, Wilson R, Wilson L. *A review of trisomy X (47,XXX)*. Orphanet Journal of Rare Diseases 2010; 5:8.
36. Torrado M, Araoz V, Baialardo E, Abraldes K, Mazza C, Krochik G, Ozuna B, Leske V, Caino S, Fano V, Chertkoff L. *Clinical-etiologic correlation in children with Prader-Willi syndrome (PWS): An interdisciplinary study*. Am J Med Genet 2007; 143A:460-468.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 12

BOLILE MONOGENICE

Bolile monogenice sunt afecțiuni produse de mutații ale unei singure gene; aceste mutații se transmit în succesiunea generațiilor după tipul mendelian: autozomal dominant, autozomal recesiv sau legat de X. De aceea, bolile monogenice mai sunt numite **boli mendeliene** și sunt repertoriate în catalogul *Mendelian Inheritance of Man* (MIM), editat de profesorul Victor McKusick (SUA); vesiunea online – OMIM – este actualizată continuu și e accesibilă în întreaga lume (vezi caseta 5.4). OMIM cuprindea circa 20.000 de fenotipuri și gene în februarie 2011, dintre care aproximativ 13.000 de intrări corespundeau unor boli monogenice.

Bolile monogenice reprezintă una dintre categoriile majore ale bolilor genetice, atât prin număr și frecvență, cât și prin consecințele importante asupra morbidității și mortalității, mai ales la copil.

Majoritatea bolilor monogenice devin manifeste clinic în perioada neonatală sau în copilărie. Doar aproximativ 10% dintre bolile monogenice cunoscute debutează clinic după pubertate, iar 1% dintre ele după sfârșitul perioadei reproductive.

Deși cele mai multe dintre aceste boli sunt rare, în ansamblul lor, ele au o pondere importantă în cadrul morbidității și mortalității la copii. *Frecvența globală* a bolilor monogenice la copii este de *circa 2-3%*, iar ponderea lor printre cauzele de spitalizare este de circa 6-8%.

Atunci când se cunosc defectul primar al unei boli monogenice, adică mutația la nivel genic, precum și consecințele la nivelul proteinei codificate, se utilizează termenul **boală moleculară**. În prezent, cel puțin 1.770 de boli monogenice pot fi încadrate în această categorie a bolilor moleculare, iar cercetările în curs de desfășurare vor permite, fără îndoială, descifrarea bazelor moleculare ale tuturor bolilor monogenice.

Studiul bolilor moleculare a produs o adevărată revoluție în medicină. El permite o *reclasificare a bolilor* în funcție de mutațiile cauzatoare și de mecanismele patogenice. Această acțiune – dublată de posibilitatea unui *diagnostic molecular*, deseori prenatal sau presimptomatic – are consecințe majore pentru asigurarea unui sfat genetic mai precis sau pentru selecția celor mai adecvate metode de tratament. Elucidarea bazelor moleculare ale bolilor monogenice este însă utilă nu numai pentru abordarea specifică a acestor afecțiuni, ci și pentru descifrarea mecanismelor moleculare care asigură desfășurarea proceselor biologice normale și, implicit, funcționarea adecvată a organismului uman. Se poate afirma că am intrat într-o nouă etapă a dezvoltării medicinii, denumită pe drept cuvânt **medicină moleculară** (vezi capitolul 1). De aceea, prezentarea unor date generale despre bazele moleculare și biochimice ale bolilor monogenice ca model pentru patogenia moleculară a tuturor bolilor umane, este nu numai benefică, dar și necesară.

A. Bazele moleculare și biochimice ale bolilor monogenice

Medicina moleculară încearcă să explice mecanismele prin care o anumită modificare genetică determină un fenotip clinic particular. În capitolul 7 au fost prezentate natura și mecanismele de producere ale mutațiilor; acest subcapitol este axat mai ales pe prezentarea consecințelor pe care mutațiile le pot avea asupra cantității și funcțiilor unui produs genic, precum și pe explicarea cauzelor pentru care aceste modificări sunt sau nu patogenice asupra unor anumite celule aflate într-un stadiu particular de dezvoltare.

Se pot deosebi două mari categorii de efecte ale mutațiilor asupra funcțiilor proteinelor codificate: mutații cu pierderea funcției și mutații cu câștig de funcție (vezi capitolul 7). Trebuie precizat că nu există o asociere preferențială între unele gene și una dintre categoriile de mutații prezentate mai sus. Ca urmare,

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

una şi aceeaşi genă poate suferi atât mutaţii cu pierderea funcţiei, cât şi mutaţii cu câştig de funcţie, iar consecinţele acestor mutaţii se pot exprima prin producerea unor boli diferite.

Un asemenea exemplu este cel al mutaţiilor genei *RET*. Această genă codifică un receptor transmembranar pentru factorul de creştere neuronal derivat din celulele gliale (GDNF). Diferite mutaţii, cu pierderea funcţiei proteinei RET, au ca rezultat producerea **bolii Hirschsprung** (OMIM # 142623), caracterizată prin absenţa neuronilor postganglionari enterici care conduce la *megacolon congenital* şi constipaţie cronică. Alte mutaţii specifice au însă ca efect un câştig de funcţie, determinând o reactivitate exagerată a receptorului faţă de ligand sau chiar activarea sa în absenţa GDNF. Aceste mutaţii au ca rezultat boli genetice diferite, precum **carcinoamele tiroidiene medulare familiale** sau **neoplaziile endocrine multiple tip 2**. Există, în sfârşit, unele mutaţii cu sens greşit care pot determina apariţia simultană a acestor boli, ceea ce sugerează că aceeaşi mutaţie poate avea efecte diferite în ţesuturi diferite.

Multe boli monogenice asociază o *variabilitate clinică* considerabilă, chiar în interiorul aceleiaşi familii, membrii afectaţi fiind purtători ai aceleiaşi mutaţii. Acest fapt sugerează intervenţia altor gene nealele, care modifică fenotipul clinic (*gene modificatoare*), sau a unor factori din mediul înconjurător.

Un exemplu de genă modificatoare este cel al genei *PLA2G2A* care codifică fosfolipaza A2. Diferite variante alelice ale acestei gene modifică numărul polipilor adenomatoşi dezvoltaţi de indivizii cu **polipoză adenomatoasă familială** (FAP – OMIM # 175100). O altă genă modificatoare, localizată pe cromozomul 19q13.2-13.4, poate influenţa severitatea manifestărilor clinice în fibroza chistică (OMIM # 219700).

1. Mutaţii cu pierderea funcţiei

Pierderea funcţiei proteinei codificate de o genă mutantă reprezintă cea mai frecventă modalitate prin care o modificare genetică produce o boală. Există numeroase *tipuri de mutaţii* care pot reduce sau aboli funcţia unui produs genic (vezi capitolul 7). Acestea pot fi: deleţii sau inserţii – ce produc schimbarea cadrului de lectură (*frameshift*); mutaţii nonsens – care determină sinteza unei proteine trunchiate; mutaţii cu sens greşit (*missense*) – ce substituie un aminoacid esenţial pentru activitatea proteinei; mutaţii la nivelul regiunilor reglatoare ale genei. Uneori se pot produce chiar *modificări epigenetice*, cum ar fi, de exemplu, atenuarea activităţii genice prin hipermetilarea (şi deci inactivarea) regiunii promotor.

Mutaţiile cu pierderea funcţiei tind să se asocieze, în general, cu o *transmitere recesivă*, deoarece la indivizii heterozigoţi (Na) alela normală (N) este capabilă să asigure singură o cantitate suficientă de proteină funcţională şi, de cele mai multe ori, organismul funcţionează normal cu doar 50% din nivelul de activitate genică.

Există însă unele mutaţii genice, relativ puţine la număr, pentru care o reducere cu 50% a nivelului de activitate determină apariţia unui fenotip anormal. Asemenea situaţii, desemnate prin termenul **haploinsuficienţă**, sunt întâlnite în special atunci când proteina codificată este necesară în cantităţi mari (celulele funcţionează în mod normal la nivelul maxim de transcripţie).

Un exemplu este cel al genei pentru elastină, ale cărei mutaţii sunt implicate în producerea **stenozei aortice supravalvulare** (OMIM # 185500). La indivizii heterozigoţi pentru asemenea mutaţii, majoritatea ţesuturilor bogate în elastină (tegumente, plămâni, vase sangvine) funcţionează normal, dar aorta supravalvulară va suferi un proces de stenozare progresivă, care poate necesita corecţie chirurgicală.

Mutaţiile asociate cu un fenomen de haploinsuficienţă tind să se *transmită dominant* şi prezintă un grad crescut de expresivitate variabilă.

În cazul proteinelor care funcţionează ca dimeri (homo- sau heterodimeri) sau în cadrul unor complexe multimerice, mutaţiile cu pierderea funcţiei pot avea drept consecinţă nu numai alterarea activităţii polipeptidului respectiv, dar şi a celui produs de alela normală sau chiar de gene nealelice.

Printre exemplele cele mai cunoscute din această categorie sunt mutaţiile genelor pentru **colagen**, care vor fi discutate în subcapitolul următor. Colagenul fibrilar, componenta majoră a ţesutului conjunctiv, este organizat sub forma unor lanţuri polipeptidice triplu elicoidale, fie homotrimerice, fie heterotrimerice. Un polipeptid anormal, care va forma un triplu helix cu două polipetide normale, va conduce la alterarea activităţii întregului complex; ca urmare, astfel de mutaţii pot reduce semnificativ – sub 50% – cantitatea de colagen funcţional (figura 12.1).

În aceste cazuri se consideră că mutaţiile au *efecte dominant negative*: se păstrează capacitatea de sinteză a unei proteine funcţionale, dar aceasta va avea activitate anormală. Mutaţiile **dominant negative** vor avea în general consecinţe fenotipice mai severe decât alte mutaţii ale aceloraşi gene care abolesc complet activitatea ei (mutaţii nule) şi se transmit după un model dominant simplu.

Efectele fenotipice ale mutaţiilor cu pierderea funcţiei depind în mare măsură de *gradul de pierdere a funcţiei* şi deci de nivelul activităţii reziduale a produsului genic. De exemplu, multe substituţii aminoacidice

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

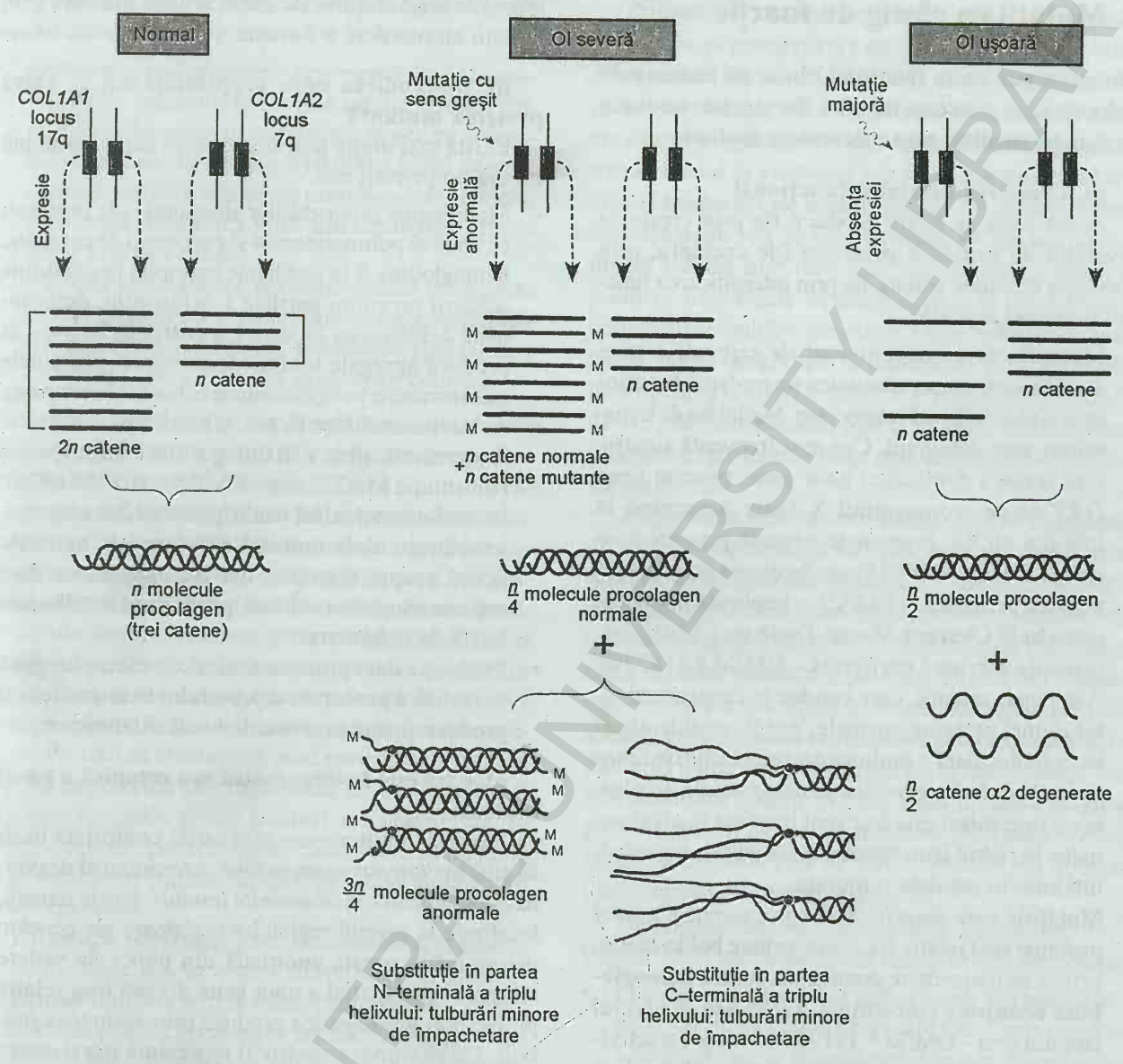


Figura 12.1. Efectele dominant negative ale mutaţiilor genelor colagenului

(după Strachan şi Read, 1999)

Fibrele de colagen sunt construite dintr-o reţea de trei unităţi helicale de procolagen. Procolagenul de tip I este alcătuit din două catene codificate de gena *COL1A1* şi o catenă codificată de gena *COL1A2*. Mutaţiile cu sens greşit au efecte dominant negative şi produc forme severe de Osteogenesis imperfecta; mutaţiile nule determină forme uşoare de boală pentru că deşi cantitatea de proteină scade se produc totuşi molecule normale de colagen.

pot avea un efect foarte redus asupra funcţiei proteice, iar altele pot aboli complet funcţia normală.

Mutaţiile cu pierderea funcţiei pot să intereseze una sau ambele alele. În a doua situaţie, indivizii sunt afectaţi, dar mutaţiile celor două alele pot fi adeseori diferite – realizând statusul de *heterozigoţi compuşi*. Dacă ambele mutaţii determină pierderea funcţiei, dar în proporţii diferite, alela cu efectul cel mai puţin sever va dicta nivelul de activitate reziduală şi implicit severitatea manifestărilor clinice. Se poate realiza astfel o *recesivitate graduală*, în care severitatea fenotipului clinic depinde de nivelul activităţii reziduale.

Un exemplu este cel al mutaţiilor care afectează gena pentru hipoxantin-guanin-fosforibozil-transferază (*HPRT*) de pe cromozomul X. Nivelul de activitate reziduală este bine corelat cu fenotipul clinic al bărbaţilor purtători ai mutaţiei. Astfel, mutaţiile care permit o menţinere a nivelului activităţii enzimatice la peste 60% nu determină nici o simptomatologie clinică; mutaţiile ce reduc nivelul activităţii enzimatice la 1,6-8% determină **gută**; o reducere la 1,4-1,6% asociază **coreoatetoza** şi automutilare, în timp ce mutaţiile ce reduc activitatea enzimatică sub 1,4% determină manifestări clinice de **sindrom Lesch-Nyhan clasic** (OMIM # 300322): coreoatetoză, automutilare şi retard mental.

BCU "VICTOR BABEŞ" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Mutații cu câștig de funcție

Mutațiile pot altera fenotipul clinic nu numai prin reducerea sau pierderea funcției, dar și printr-un câștig de funcție, realizat prin mecanisme multiple

a). Creșterea nivelului funcțional

Acest efect se poate produce fie prin creșterea nivelului de sinteză a proteinei (de exemplu, prin creșterea dozajului genic), fie prin intensificarea funcției proteinei normale.

- Mutațiile care *cresc nivelul de expresie* a unei gene și, ca urmare, cantitatea de proteină funcțională sintetizată sunt relativ rare. Modul lor de transmitere este dominant. Cea mai frecventă situație este aceea a duplicației unor gene, precum gena *DAX* de pe cromozomul X (care determină la indivizi 46,XY inversiune sexuală prin *efect de dozaj* – OMIM # 300018) sau duplicația genei pentru mielina periferică – *PMP22* – implicată în producerea **bolii Charcot-Marie-Tooth** tip 1A (degenerescența nervoasă periferică – OMIM # 118220). Asemenea mutații, care conduc la creșterea nivelului unei proteine normale, pot fi considerate și baza moleculară a multora dintre trăsăturile fenotipice în cadrul *trisomiilor cromozomiale*. În plus, acest mecanism este frecvent implicat la nivel somatic în cadrul fenomenelor de *amplificare genică*, întâlnite în celulele tumorale.
- Mutațiile care *amplifică funcția normală* a unei proteine sunt relativ frecvente printre bolile monogenice cu transmitere dominantă. Astfel, **hemoglobina Kempsey** (substituția Asp99Asn la nivelul lanțului beta – OMIM * 141900.0146) se caracterizează prin accentuarea afinității pentru oxigen și, ca urmare, o reducere a nivelului de eliberare a acestuia la nivelul țesuturilor periferice. Un alt exemplu este cel al **acondroplaziei** (OMIM # 100800), boală caracterizată prin hipostatură disproporționată, în care substituția unui singur aminoacid în structura FGFR3 (receptorul tip 3 pentru factorul de creștere a fibroblastelor) determină o activare permanentă a acestui receptor, chiar în absența ligandului.

Recunoașterea bolilor genetice produse prin mutații cu câștig de funcție prin creșterea nivelului funcțional este foarte importantă, deoarece *tratamentul acestora diferă în mod esențial* de cel al bolilor produse prin mutații cu pierdere a funcției.

b). Dobândirea unor proprietăți noi de către proteina mutantă

Există mai multe mecanisme prin care o proteină capătă proprietăți noi.

- Modificarea proprietăților structurale ale proteinei ce tinde să polimerizeze și să precipite (de exemplu, hemoglobina S în sicklemie precipită în condițiile scăderii presiunii parțiale a oxigenului, determinând deformarea în seceră a eritrocitelor) sau să producă agregate toxice (de exemplu, proteinele cu expansiune poliglutaminică în boala Huntington).
- Achiziția unei funcții noi. Un exemplu ilustrativ îl reprezintă **alela Pittsburg** a alfa1-antitripsinei (substituția Met358Arg – OMIM * 107400.0026). În mod normal, alfa1-antitripsina inhibă *elastaza*; în schimb, alela mutantă Pittsburg nu mai este activă asupra elastazei, dar are capacitatea de a acționa asupra *trombinei*, producând o tulburare letală de coagulare.
- Producția unei proteine toxice; de exemplu, gena ce codifică precursorul peptidului beta-amiloid și produce forme precoce de boală Alzheimer.

c). Expresia heterocronică sau ectopică a genei mutante

Expresia multor gene este astfel controlată încât să aibă loc *într-un moment bine determinat* al dezvoltării ontogenetice și *în anumite țesuturi*. Unele mutații, localizate la nivelul regiunilor reglatoare ale genelor, determină expresia anormală din punct de vedere temporal sau spațial a unor gene. Există însă relativ puține boli monogenice produse prin asemenea mutații. Un exemplu sugestiv îl reprezintă **persistența ereditară a hemoglobinei fetale** (OMIM # 141749), în care mutații în regiunile reglatoare ale genelor pentru hemoglobină determină expresia la adult a hemoglobinei γ, sintetizată în mod normal numai în viața fetală și în perioada neonatală.

Asemenea mutații apar însă mult mai frecvent în cadrul cancerelor. Așa cum va fi prezentat în capitolul 18, protooncogenele sunt gene care promovează proliferarea celulară normală în cursul perioadei de dezvoltare embrionară. Expresia acestor gene în celulele somatice adulte are drept consecință proliferarea celulară necontrolată, care va conduce la dezvoltarea neoplaziilor.

B. BOLI MOLECULARE

Așa cum s-a precizat la începutul acestui capitol, bolile monogenice pentru care sunt descifrate mecanismele moleculare și biochimice sunt denumite și *boli moleculare*. Clasificările bolilor moleculare sunt dificile având în vedere complexitatea mecanismelor patogenice care stau la baza lor. De aceea, o clasificare simplă, dar utilă, împarte bolile moleculare în funcție de *clasa din care face parte proteina anormală, mutantă*.

BCU IAȘI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

Proteinele pot fi clasificate, în primul rând după *modul lor de expresie*, în:

- *proteine „de întreținere sau menajere"* (*housekeeping*), prezente la nivelul tuturor țesuturilor, cu rol fundamental în menținerea structurii și funcțiilor celulare; la om, circa 10.000-15.000 de gene comune codifică asemenea proteine *de întreținere*, care reprezintă circa 90% din cantitatea proteinelor oricărei celule;
- *proteine specializate*, prezente numai în anumite țesuturi, având rol în determinarea caracteristicilor fiecărui țesut diferențiat; proteinele specializate reprezintă circa 10% din proteinele celulare.

Această clasificare nu este absolută, deoarece unele proteine *de întreținere* pot fi exprimate la niveluri mai înalte în anumite țesuturi.

În general, datorită rolului lor major în activitatea tuturor celulelor și țesuturilor, mutațiile genelor comune sunt incompatibile cu supraviețuirea și vor produce rareori boli genetice. În aceste cazuri însă, mutațiile unor asemenea gene vor determina boli care se manifestă clinic la nivelul acelor țesuturi în care proteina respectivă este exprimată la un nivel maxim. Mutațiile genelor care codifică proteine specializate tind să afecteze în mod particular țesutul în care acea proteină este exprimată. Uneori însă pot fi afectate secundar și alte țesuturi sau organe sau, în mod paradoxal, pot fi evidente clinic numai simptome la nivelul unor organe, în care proteina mutantă nu este exprimată.

Proteinele pot fi clasificate, de asemenea, în funcție de *activitatea* lor, în câteva clase majore: enzime, proteine implicate în transport, proteine structurale, proteine implicate în controlul homeostaziei, proteine implicate în comunicarea intracelulară și proteine implicate în controlul dezvoltării și diferențierii. Delimitarea acestor clase de proteine nu este întotdeauna facilă, întrucât multe proteine pot fi implicate adeseori *în mai multe activități*, prin intermediul domeniilor lor funcționale diferite. Considerăm însă utilă o prezentare schematică a unor date generale privind bolile moleculare produse prin mutații ale unor asemenea clase de proteine, exemplificate prin intermediul unor afecțiuni cu impact clinic deosebit prin frecvență sau prin severitatea manifestărilor clinice.

1. Boli enzimatice (erori înnăscute de metabolism)

Toate procesele metabolice celulare sunt catalizate de către *enzime*. Mutațiile care modifică eficiența acestor proteine vor perturba adeseori metabolismul celular până la un nivel ce determină apariția bolii.

Primele boli enzimatice (alcaptonuria, albinismul, cistinuria și pentozuria) au fost descrise de către Archibald Garrod (1902-1908), care a demonstrat că aceste enzimopatii sunt transmise ereditar, în concordanță cu legile lui Mendel. Astfel, Garrod a introdus mendelismul în medicină și a formulat conceptul de **„erori înnăscute de metabolism"**. De atunci au fost descrise peste 350 de boli enzimatice. Cele mai multe dintre acestea sunt rare, dar luate împreună dețin o pondere importantă în morbiditatea și mortalitatea consecutive bolilor genetice. După estimările mai vechi, bolile metabolice ar reprezenta 10% din bolile monogenice la copii și ar avea o frecvență cumulată de 1/2.500 nou-născuți; foarte probabil acestea sunt subestimări ale fenomenului real, datorită dificultăților de diagnostic.

Majoritatea bolilor enzimatice sunt determinate de mutații cu pierderea funcției, care sunt transmise recesiv, autozomal sau legat de X, afectând indivizii care sunt purtători a două alele mutante (homozigoți sau heterozigoți compuși). La heterozigoți (Na), deși alela mutantă produce o proteină cu activitate enzimatică redusă sau chiar absentă, fenotipul nu este alterat deoarece alela normală asigură cel puțin 50% din activitatea enzimatică necesară. În realitate, au fost raportate situații în care alela mutantă asigură un nivel normal al reacției catalizate, chiar dacă nivelul funcției reziduale este de circa 10% din cel normal (de exemplu, hexozaminidaza A).

Deficiența enzimatică produce un „bloc metabolic" (figura 12.2) care poate avea următoarele consecințe:

- *acumularea* (stocarea) substratului sau precursorilor, cu efecte fenotipice diferite – atunci când substratul care se acumulează este o moleculă mică și ușor difuzabilă (precum fenilalanina), poate avea loc o redistribuție în întregul organism, iar manifestările clinice pot fi adeseori sistemice, pe când în cazul unor macromolecule, acestea vor rămâne la nivelul țesutului respectiv și vor determina în special manifestări clinice localizate;
- *devierea* căii metabolice și sinteza unor produși toxici;
- *deficitul* unui produs de reacție (final sau intermediar) sau o combinație „deficit și acumulare";
- *deficite enzimatice multiple* pot fi întâlnite atunci când enzimele folosesc același cofactor sau au o subunitate sau o proteină activatoare/stabilizatoare comună;
- lipsa controlului *feedback* datorită absenței produsului final.

Deficite ale unor enzime diferite, care intervin însă în aceeași cale metabolică, pot duce la manifestări clinice asemănătoare (de exemplu, mucopolizaharidozele). Pe de altă parte, deficitul parțial sau complet

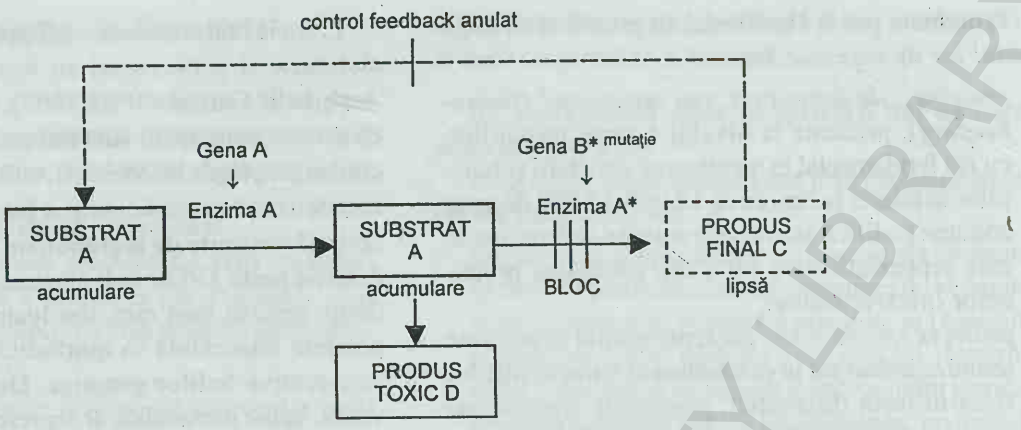


Figura 12.2. Consecințele unui bloc metabolic produs printr-un deficit enzimatic

al aceleiași enzime poate determina boli diferite (vezi exemplul HPRT amintit anterior).

Toate căile metabolice pot fi afectate prin deficiențe enzimatice. Tabelul 12.1 sintetizează principalele categorii de boli metabolice, exemplificate cu cele mai frecvente și cunoscute afecțiuni[1] . În ceea ce urmează vom prezenta sintetic doar câteva dintre cele mai frecvente enzimopatii.

1.1. Galactozemia

Definiție. Galactozemia este o boală rară caracterizată prin inabilitatea individuală de metabolizare completă a galactozei din lapte. Au fost descrise trei tipuri de galactozemie, determinate de către deficiența a trei enzime ce acționează secvențial în transformarea galactozei în glucoză.

Incidență. Tipul I (forma clasică de galactozemie) este cea mai frecventă boală monogenică care interesează metabolismul carbohidraților, afectând între 1/30.000 și 1/60.000 din nou-născuți. Tipul II are o incidență de 1/100.000 din nou-născuți, iar tipul III este foarte rar. În cadrul diverselor populații incidența este variabilă.

Manifestări clinice. În cazul formei clasice manifestările apar la sugar, după câteva zile de alimentație lactată, constând în incapacitate de hrănire, icter, vărsături, diaree, letargie, iritabilitate și convulsii. La examenul obiectiv se poate constata: hepatomegalie cu insuficiență hepatică, ascită, tulburări neurologice, cataractă și întârziere în dezvoltarea neuromotorie. Investigațiile paraclinice pot pune în evidență hipoglicemia și aminoaciduria. Pe termen îndelungat afecțiunea determină retard în creștere, retard mental, ciroză hepatică macronodulară și insuficiență ovariană la femei. În cazul tipului II de boală manifestările sunt mai puțin severe, nu apar tulburările neurologice și ciroza, iar în cazul tipului III există două forme, una benignă – fără simptome (depistată prin *screening* neonatal) și una severă.

Genetică. Galactozemia se transmite autozomal recesiv, dar cauza este diferită în cazul celor trei tipuri, deoarece acestea sunt determinate de un deficit enzimatic specific pentru una din cele trei enzime implicate în metabolizarea galactozei, care sunt codificate de trei gene distincte (tabelul 12.2).

Gena *GALT* este alcătuită din 11 exoni, iar în peste 70% din cazuri, la caucazieni, boala este determinată de o singură mutație punctiformă la nivelul exonului 6, care conduce la substituția unei glutamine cu arginina (Q188R). Indivizii homozigoți pentru această mutație au o activitate enzimatică reziduală de circa 10%, ceea ce afectează capacitatea de conversie a galactozei în glucoză. O altă variantă alelică hipomorfă a genei *GALT* determină un deficit enzimatic de circa 50%, ceea ce duce la apariția unui fenotip clinic mai blând al galactozemiei, numit varianta Duarte. Galactozemia poate fi determinată, de asemenea, de mutații ale genelor care codifică galactokinaza și uridin difosfat galactozo-4-epimeraza (UDP-galactozo-4-epimeraza). Deficiența galactokinazei induce dezvoltarea cataractei, dar nu determină retard de creștere, retard mental sau afectare hepatică. Deficiența UDP-galactozo-4-epimerazei poate fi limitată numai la nivelul eritrocitelor și leucocitelor, dar în acest caz nu determină manifestări clinice sau poate fi sistemică și determină manifestări clinice similare galactozemiei clasice.

Patogenie. Deficitul uneia din cele trei enzime implicate în metabolizarea galactozei duce la acumularea galactozo-1-fosfatului și galactiolului, cu efecte diferite, primul metabolit fiind toxic pentru ficat, creier și rinichi, iar cel de al doilea afectează cristalinul (figura 12.3). Secundar, blocarea căii metabolice

1. Cititorul interesat va găsi informații exhaustive în tratatul *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver *et al.*, ed. a VIII-a, 2001), în care bolile metabolice sunt grupate pe metabolisme. Informații suplimentare prețioase se găsesc și în capitolul *Boli genetice de metabolism* (Paula Grigorescu-Sido) din *Tratatul de Pediatrie* (E. Ciofu, C. Ciofu, 2001) sau se pot obține prin accesarea OMIM.

BCU "IULIU HAȚIEGANU" UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 12.1. Exemple de boli genetice produse prin deficite enzimatice

Enzima	Gena	Localizarea cromozomială	Boala	OMIM
Boli ale metabolismului carbohidraților				
Galactozo-1-fosfat uridil transferaza	*GALT*	9p13	Galactozemia clasică	# 230400
Fructozo 1,6-bifosfat aldolaza	*ALDOB*	9q13-q32	Intoleranța ereditară la fructoză	# 229600
Fructokinaza	*KHK*	2p23	Fructozuria	+ 229800
Lactaza	*LCT*	2q21	Hipolactazia adultului	# 223100
Glucokinaza	*GCK*	7p13	Diabetul MODY (maturity onset diabet of youth)	* 606321
Glucozo-6-fosfataza	*G6PC*	17q21	Glicogenoza tip Ia (von Gierke)	# 232200
Alfa-glicozidaza acidă	*GAA*	17q25.2	Glicogenoza tip II (Pompe)	# 232300
Amilo-1,6-glucozidaza	*AGL*	1p21	Glicogenoza tip IIIa (Cori)	# 232400
Enzima de ramificare a glicogenului	*GBE1*	3p12	Glicogenoza tip IV (Anderson)	# 232500
Fosforilaza musculară	*PYGM*	11q13	Glicogenoza tip V (McArdle)	# 232600
Boli ale metabolismului aminoacizilor				
Fenilalanin hidroxilaza	*PAH*	12q24.1	Fenilcetonuria	# 261600
Fumarilacetoacetat hidrolaza	*FAH*	15q23-q25	Tirozinemia tip 1	+ 276700
Cistation beta-sintetaza	*CBS*	21q22.3	Homocistinuria	# 236200
Tirozinaza	*TYR*	11q14-q21	Albinismul oculo-cutanat	# 203100
Argininosuccinat sintetaza	*ASS*	9q34	Citrulinemia clasică	# 215700
Boli ale metabolismului lipidic				
Acil CoA dehidrogenaza lanțurilor medii	*ACADM*	1p31	MCAD (*Medium Chain Acyl Dehydrogenase Deficinecy*)	* 607008
Acil CoA dehidrogenaza lanțurilor lungi	*ACADL*	2q34-q35	LCAD (*Long Chain Acyl Dehydrogenase Deficinecy*)	# 201460
Acil CoA dehidrogenaza lanțurilor scurte	*ACADS*	12q22qter	SCAD (*Short Chain Acyl Dehydrogenase Deficinecy*)	# 201470
Boli ale metabolismului purinic și pirimidinic				
Hipoxantin guanin fosforiboziltransferaza	*HPRT1*	Xq26-q27.2	Sindromul Lesch-Nyhan	# 300322
Adenozin deaminaza	*ADA*	20q13.11	Imunodeficiența combinată severă	# 102700
Boli ale metabolismului acizilor organici				
Homogentizic acid oxidaza	*HGD*	3q21-q23	Alcaptonuria	# 203500
Metilmalonil-CoA mutaza	*MUT*	6p21	Acidemia metilmalonică	# 251000
Propionil-CoA carboxilaza	*PCCA*	13q32	Acidemia propionică	# 606054
Boli ale metabolismului porfirinelor și hemului				
Porfobilinogen deaminaza	*PBGD*	11q23.3	Porfiria acută intermitentă	# 176000
Uroporfirinogen decarboxilaza	*UROD*	1p34	Porfiria cutanea tarda	# 176100
Protoporfirinogen oxidaza	*PPOX*	1q22	Porfiria variegata	# 176200
UDP-glucuronozil transferaza	*UGT1A1*	2q37	Sindromul Gilbert	# 143500
Boli ale enzimelor lizozomale				
Alfa-L-iduronidaza	*IDUA*	4p16.3	Boala Hurler-Scheie	* 252800
Beta-hexozaminidaza, izoenzima A	*HEXA*	15q23-q24	Boala Tay-Sachs	# 272800
Beta-glucozidaza acidă	*GBA*	1q21	Boala Gaucher tip 1	# 230800
Sfingomielinaza acidă	*ASM*	11p15.4	Boala Niemann-Pick	# 257200
Alfa-galactozidaza A	*GLA*	Xq22	Boala Fabry	# 301500
Boli ale enzimelor peroxizomale				
Catalaza	*CAT*	11p13	Acatalazemia	+ 115500
Fitanoil CoA hidroxilaza	*PAHX*	10p11.2	Boala Refsum	# 266500
Tulburări în producția de energie				
Piruvat carboxilaza	*PC*	11q13.4	Sindromul Leigh	# 266150
Piruvat decarboxilaza	*PDH*	Xp22.1	Ataxia cu acidoză lactică tip I	^ 208800
Boli ale enzimelor implicate în sinteza hormonilor				
21-hidroxilaza	*CYP21A2*	6p21.3	Hiperplazia adrenaliană congenitală	+ 201910
Defecte ale enzimelor extracelulare				
Alfa-1 antitripsina	*PI*	14q32.1	Deficitul de alfa-1 antitripsina	* 107400

Tabelul 12.2. Specificitatea genetică a celor trei forme de gaalactozemie

Tip	Boala	OMIM	Gena	Locus	Enzima
I	Galactozemie clasică	# 230400	*GALT*	9p13	Galactozo-1-P-uridil-transferaza
II	Deficit de galactokinază	# 230200	*GALK1*	17q24	Galactokinaza-1
III	Deficit de galactozo-epimerază sau deficit de UDP-galactozo-4-epimerază	# 230350	*GALE*	1p36-35	UDP-galactozo-4-epimeraza

duce la acumularea galactozei, a cărei exces determină glicozilarea anormală a unor proteine, respectiv modificarea structurii acestora şi tulburări metabolice complexe.

Diagnostic. Galactozemia este confundată clinic uneori cu *intoleranţa pentru lactoză*, dar aceasta se caracterizează prin dureri abdominale ce apar după ingestia de produse lactate, fără efecte pe termen lung. Diagnosticul se bazează pe datele clinice şi examenele de laborator, care relevă galactozurie, valori crescute ale galactozei serice şi mai ales activitatea redusă a galactozo-1-fosfat uridil transferazei plasmatice. În prezent identificarea homozigoţilor recesivi se poate efectua prin *screening neonatal*, realizat prin măsurarea activităţii plasmatice a galactozo-1-fosfat uridil transferazei într-o picătură uscată de sânge. Identificarea timpurie permite instituirea precoce a tratamentului dietetic, care constă în eliminarea aportului de galactoză. Este posibil şi *diagnosticul prenatal.*

Tratament. După stabilirea diagnosticului, strategia terapeutică pune accentul pe recomandarea unei diete fără lapte, produse lactate sau preparate alimentare ce includ laptele şi derivatele sale. De asemenea, este necesară suplimentarea cu preparate de calciu, având în vedere excluderea lui prin dieta fără lapte şi derivate lactate. Acest tratament dietetic prin reducerea aportului alimentar de galactoză permite prevenirea substanţială a morbidităţii asociate efectelor acute induse de metabolitii galactozei. Cu toate acestea, tratamentul dietetic nu influenţează instalarea disfuncţiei cerebrale şi nici a insuficienţei ovariene.

Prognostic. Având în vedere heterogenitatea genetică a galactozemiei, precum şi posibilitatea stabilirii certe a diagnosticului şi a strategiei terapeutice, prognosticul este rezervat şi variabil la diferiţi pacienţi. În cazurile la care diagnosticul nu a fost stabilit, sau tratamentul nu a fost instituit, mortalitatea este de circa 75% în primele două săptămâni după naştere, în cele mai multe cazuri prin septicemie cu *E. coli*. Dacă diagnosticul este stabilit timpuriu, speranţa de viaţă este relativ normală, cu condiţia respectării dietei şi a educării copilului în acest sens.

1.2. Fenilcetonuria

Definiţie. Fenilcetonuria (OMIM # 261600) este o boală monogenică determinată de o deficienţă a metabolismului fenilalaninei, ce are drept consecinţe absenţa sau reducerea ratei de transformare a acestui aminoacid în tirozină, respectiv creşterea nivelului seric şi metabolizarea lui pe căi secundare (vezi figura 4.3).

Incidenţă. Fenilcetonuria are o incidenţă medie, de circa 1/15.000 nou-născuti la caucazieni, dar aceasta variază în diferite populaţii.

Manifestări clinice. Acestea variază de la forme medii spre severe şi se instalează, de obicei, în absenţa tratamentului, după primul trimestru de viaţă. Nou-născutul este indemn din punct de vedere clinic, cu excepţia pigmentaţiei cutanate reduse asociată cu păr blond şi ochi albaştri (toate aceste semne fiind determinate de deficitul de tirozină, un precursor al melaninei). Boala se manifestă prin tulburări neurologice,

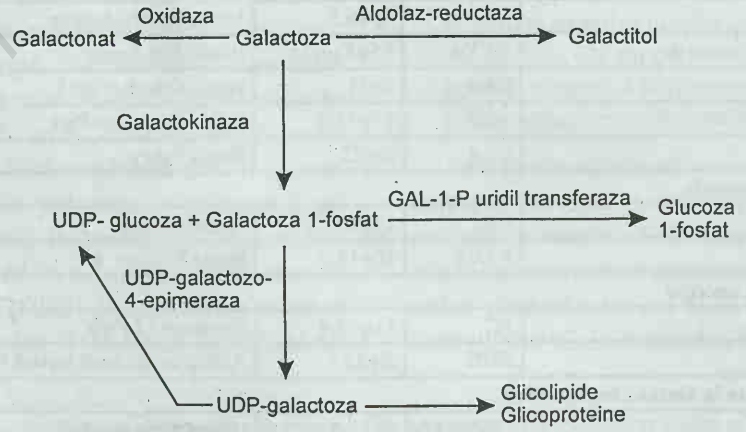


Figura 12.3. Căile majore ale metabolismului galactozei şi consecinţele metabolismului alternativ în cazul deficitelor enzimatice care determină galactozemia

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

retard somatic şi retard mental; la aceste fenomene se mai pot asocia un miros particular al urinii, sudorii, pielii şi părului („de şoarece" sau „de hambar") şi o dermatită cronică descuamativă.

Genetică. Fenilcetonuria este o boală cu transmitere autozomal recesivă, determinată fie de mutaţii ale genei *PAH* (ce determină forma clasică de fenilcetonurie sau un spectru de hiperfenialaninemii mai puţin severe), fie de mutaţii ale genelor *HPABH4A, HPABH4B, HPABH4C şi HPABH4D* (ce determină deficitul de tetrahidrobiopterină). Gena *PAH* este localizată pe cromozomul 12q24.1 şi codifică fenilalanin-hidroxilaza, enzima ce transformă fenilalanina în tirozină.

Studiile ulterioare au evidenţiat o mare heterogenitate alelică la indivizii bolnavi, fiind descrise peste 500 de mutaţii, dar majoritatea acestora sunt foarte rare. Circa două treimi din cazurile de fenilcetonurie au drept cauză următoarele şase tipuri de mutaţii: a) substituţii cu sens greşit – 62%; b) deleţii mici – 13%; c) decalarea cadrului de lectură – 11%; d) mutaţii silenţioase – 6%; e) mutaţii non-sens – 5%; f) inserţii – 2%). Datorită multitudinii acestor mutaţii, cei mai mulţi dintre bolnavi sunt heterozigoţi compuşi, iar acest fapt determină o diversitate largă a nivelelor reziduale ale activităţii enzimatice.

Patogenie. Deficitul de fenilalanin-hidroxilază determină incapacitatea de transformare a fenilalaninei în tirozină, ce duce la acumularea în organism a fenilalaninei şi ai unor metaboliţi ai acesteia (acizii fenilpiruvic, fenillactic şi fenilacetic), care determină leziuni ale sistemului nervos central în primii ani de copilărie. Excluderea fenilalaninei din alimentaţie previne apariţia acestor manifestări. Aproximativ o treime din pacienţii cu hiperfenilalaninemie nu prezintă mutaţii la nivelul *PAH*, ci în genele ce codifică enzime implicate în metabolismul tetrahidrobiopterinei (BH4), un cofactor al PAH. Aceste enzime sunt: pterin-4-alfa-carbinolamin dehidraza (PCD), dihidropteridin reductaza (DHPR), guanozin-trifosfat ciclohidraza (GTP-CH) şi 6-piruvoiltetrahidropterin sintetaza (6-PTS) – vezi figura 12.4. În cazul acestor pacienţi, restricţia de fenilalanină în aportul alimentar nu este eficientă în prevenirea complicaţiilor neurologice, deoarece BH4 este cofactor pentru alte două enzime: tirozin-hidroxilaza şi triptofan-hidroxilaza, care intervin în sinteza unor neurotransmiţători monoaminci precum DOPA, norepinefrina, epinefrina şi serotonina. Ca urmare, la aceşti pacienţi este necesară suplimentarea cu L-DOPA şi 5-hidroxitriptofan.

Diagnostic. Diagnosticul de certitudine se stabileşte pe baza următoarelor criterii: fenilalanina plasmatică mai mare de 20 mg/dl; eliminarea urinară crescută de acid fenil-piruvic şi orto-hidroxi-fenil acetic; tirozina plasmatică normală; valoarea normală a tetrahidrobiopterinei. Este important ca diagnosticul să se precizeze la nou-născut, înaintea apariţiei semnelor

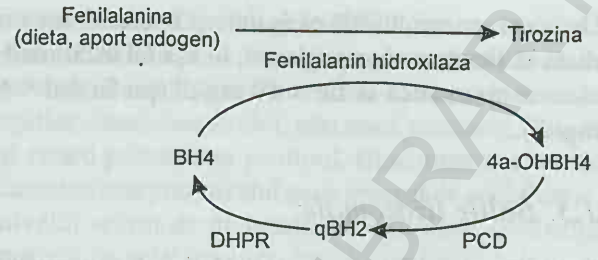


Figura 12.4. Căile metabolice afectate în hiperfenilalaninemii

BH4 – tetrahidrobiopterina, qBH2 – quininoid dihidrobiopterina.

clinice, deoarece dieta restrictivă în fenilalanină previne instalarea acestora şi asigură o dezvoltare somatică şi neuro-psihică normală. În acest scop, în majoritatea ţărilor au fost instituite programe de *screening* al bolii, care se derulează în maternităţi, după primele 3 zile de viaţă (interval în care copilul a primit fenilalanina, prin alimentaţia lactată), folosind testul Güthrie (bazat pe inhibiţia creşterii coloniilor de *Bacillus subtilis* de către fenilalanina din sânge) sau dozarea prin HPLC (cromatografie lichidă de performanţă înaltă). În cazurile cu test pozitiv se impune evaluarea completă a pacienţilor, pentru precizarea diagnosticului.

Diagnosticul diferenţial. Diagnosticul diferenţial trebuie să excludă alte cauze de hiperfenilalaninemie la nou-născut, care prezintă un nivel scăzut de dopamină, respectiv unul crescut de prolactină, în contrast cu forma clasică unde nivelul de prolactină este relativ normal. În cazul nedorit al unui diagnostic stabilit tardiv trebuie excluse alte cauze de encefalopatie cu spasticitate sau de sindrom convulsiv şi retard mental.

Tratament. Tratamentul este dietetic, având ca obiectiv reducerea aportului de fenilalanină la minimum necesar pentru asigurarea dezvoltării organismului, în aşa fel încât fenilalanina plasmatică să se menţină la valori între 2-10 mg/dl (preferabil < 6 mg/dl). Momentul iniţierii tratamentului trebuie să fie cât mai precoce, în prima lună de viaţă, cel mai târziu în primul trimestru, iar durata este indefinită. În hiperfenilalaninemiile prin deficit de tetrahidrobiopterină este necesară suplimentarea cu acest cofactor al fenilalanin-hidroxilazei şi al tirozin-hidroxilazei. Tratamentul *„pe viaţă"* al bolnavilor cu fenilcetonurie este scump şi deseori greu de aplicat. De aceea se fac eforturi pentru introducerea terapiilor celulare, fie transplante de celule hepatice derivate din celule stem, fie celule modificate prin terapie genică; rezultatele actuale sunt promiţătoare

Prognostic. Dacă diagnosticul se face la naştere şi tratamentul dietetic este bine condus prognosticul este bun, indivizii afectaţi având o viaţă cvasi-normală. Femeile cu fenilcetonurie pot da însă naştere unor copii cu retard mental şi microcefalie (encefalopatia fenilpiruvică), deficit de creştere şi malformaţii cardiace dacă prezintă valori înalte ale fenilalaninei plasmatice.

De aceea, se recomandă ca înainte şi în cursul sarcinii dieta să fie strict supravegheată, în aşa fel încât fenilalanina plasmatică să fie < 10 mg/dl (preferabil < 6 mg/dl).

1.3. Bolile lizozomale

Bolile lizozomale sunt cauzate de deficitul unor enzime (hidrolaze) sau a altor proteine lizozomale funcţionale, care determină acumularea substratului nemetabolizat în lizozomi, la nivelul sistemului nervos central, viscerelor sau miocardului. Au fost descrise până în prezent peste 40 de boli lizozomale, care realizează împreună o frecvenţă de 1/5.000-1/10.000 nou-născuţi. În funcţie de substratul metabolic acumulat, ele se grupează în mai multe categorii; cele mai importante sunt sfingolipidozele, mucopolizaharidozele şi mucolipidoze. O parte dintre aceste boli beneficiază în prezent de tratament prin transplant medular sau tratament substitutiv cu enzime produse prin tehnologia ADN recombinant (vezi capitolul 20).

a. Sfingolipidozele constau în acumularea sfingolipidelor neutre şi gangliozidelor sau a unor produşi de metabolism ai acestora, predominant la nivelul substanţei albe (leucodistrofiile) sau a substanţei cenuşii (gangliozidozele) din SNC, mai rar în alte ţesuturi. De aceea, majoritatea sfingolipidozelor determină suferinţă neurologică, secundară acumulării substratului nemetabolizat. Principalele tipuri de sfingolipidoze sunt: *boala Gaucher* (prin deficit de b-glucozidază), *boala Fabry* (prin deficit de a-galactozidază), *gangliozidoza* GM_1 (prin deficit de b-galactozidază), *gangliozidoza* GM_2 (prin deficit de b-hexozaminidază A) sau *boala Tay-Sachs*, *boala Niemann-Pick* (prin deficit de sfingomielinază) şi *leucodistrofia metacromatică* (prin deficit de arilsulfatază A).

Boala Gaucher este cea mai frecventă boală lizozomală (1:50.000 nou-născuţi), fiind produsă de către deficitul de b-glucozidază, cauzat de o serie de mutaţii la nivelul genei *GBA*, localizată pe cromozomul 1q21. În funcţie de severitatea deficitului enzimatic, vârsta de debut, prezenţa sau absenţa suferinţei neurologice şi evoluţie, se descriu trei tipuri de boală Gaucher: *tipul I* (forma cronică, adultă sau non-neuronopatică), *tipul II* (infantil, neuronopatic acut) şi *tipul III* (juvenil, neuronopatic subacut). Boala se manifestă prin: splenomegalie şi hepatomegalie impresionantă; osteopatie, tradusă pe plan clinic prin dureri (crizele osoase) şi fracturi mai ales la nivelul oaselor membrelor, corpilor vertebrelor toracice şi pelvisului; simptome secundare de pancitopenie (sindromul anemic şi sindromul hemoragipar); suferinţă neurologică (în tipul II şi III). Testele specifice sunt: activitatea redusă a b-glucozidazei în leucocite şi prezenţa mutaţiei genice (analiza ADN). Boala Gaucher tipul I beneficiază de tratament enzimatic substitutiv cu o imingluceraza (forma modificată a beta glucosidazei umane, obţinută prin tehnologia ADN recombinant) (vezi Caseta 12.1).

b. Mucopolizaharidozele (MPZ) sunt boli cu evoluţie progresivă, cauzate de acumularea intralizozomală în exces a mucopolizaharidelor acide, consecutivă deficitului unor enzime lizozomale. Mucopolizaharidele acide (glicozaminoglicanii) se leagă de obicei de proteine, cu care formează proteoglicanii, constituenţi majori ai substanţei de bază a ţesutului conjunctiv. În funcţie de defectul enzimatic se deosebesc mai multe tipuri de MPZ, diferite prin defectul enzimatic; cele mai frecvente sunt tipul I (*sindromul*

CASETA 12.1

Progrese şi speranţe în diagnosticul şi tratamentul bolilor lizozomale în România

Bolile lizozomale sunt relativ numeroase (peste 40) şi, în ansamblul lor au o frecvenţă de 1:5.000 nou-născuţi. Consecinţele clinice sunt deseori grave şi, fără tratament, speranţa de viaţă este redusă. În ultimele două decenii s-au realizat însă progrese decisive în diagnosticul enzimatic şi molecular al acestor boli, dublate de introducerea unei terapii eficiente de înlocuire a enzimelor deficiente. Astfel, compania Genzyme a pus la dispoziţie metoda de testare DBS („dried blood spot"), o metodă simplă şi sigură pentru diagnosticul de certitudine a bolilor lizozomale (pe bază de flurimetrie sau spectroscopie de masă în tandem). Aceeaşi companie produce câteva medicamente eficace (obţinute prin tehnologia ADN recombinant) în terapie de înlocuire enzimatică în bolile lizozomale mai frecvente: Cerezyme (imiglucerază, forma recombinantă a beta-glucozidazei) pentru boala Gaucher tip I şi III, Fabrazyme (agalzidaza beta, forma recombinantă a alfa-galactozidazei umane) în boala Fabry şi Aldurazyme (laronidaza, forma recombinantă a alfa-L-iduronidazei) în mucopolizaharidoza tip I.

În anul 1997, s-a înfiinţat la Cluj Centrul naţional de diagnostic şi tratament a bolilor lizozomale (condus de distinsa noastră colegă Doamna profesor Paula Grigorescu-Sido). Aici au fost diagnosticaţi enzimatic şi molecular peste 100 de pacienţi cu boli lizozomale din Romania. Din păcate, tratamentele cronice sunt scumpe şi nu s-ar fi putut realiza fără sprijinul generos al companiei Genzyme.

Hurler); tipul II (*sindromul Hunter*); tipul III (*sindromul Sanfilippo*), tipul IV (*sindromul Morquio*). Simptomele şi semnele întâlnite în MPZ pot fi cauzate de acumularea tisulară de glicozaminoglicani (trăsături infiltrate ale feţei, tegumente îngroşate, opacifierea corneei şi hepato-spleno-cardiomegalie), deficitul funcţiilor celulare (retard mental, deficit de creştere, displazie osoasă) sau de interferenţa dintre glicozaminoglicanii acumulaţi şi colagen sau fibronectină (osteoartropatie cu anchiloza în flexie, hernii).

c. Mucolipidozele se prezintă sub 4 tipuri: *sialidoza* (prin deficit de glicoprotein-sialidază), *mucolipidoza tip II* (boala cu celule I, secundară deficitului de N-acetil-glucozamino-fosfotransferază), *mucolipidoza III* (o formă mai puţin severă a aceluiaşi deficit enzimatic) şi *galactosialidoza.*

1.4. Bolile peroxizomale

Peroxizomii sunt organite subcelulare delimitate de o membrană lipidică trilaminară, prezenţi în toate celulele, dar abundenţi în ficat şi rinichi. Matricea lor conţine peste 40 de enzime implicate în reacţiile de beta-oxidare ale acizilor graşi cu lanţ foarte lung (între 20-26 atomi de carbon), producerea de plasmalogen, biosinteza acizilor biliari şi a colesterolului. Ca urmare, bolile peroxizomale se caracterizează prin creşterea nivelului de acizi graşi cu lanţ foarte lung (cu excepţia condrodisplaziei rizomelice), care constituie un marker biochimic pentru *screening* sau diagnostic. Incidenţa combinată a bolilor peroxizomale este mai mică de 1/20.000, dintre care cea mai frecventă – adrenoleucodistrofia are o incidenţă de 1/17.000. Există două categorii principale de boli peroxizomale, produse fie de tulburări în *biogeneza peroxizomilor* (de exemplu, sindromul Zellweger, în care există o *reducere marcată a numărului de peroxizomi*), fie prin deficienţa unei anumite enzime peroxizomale (de exemplu, adrenoleucodistrofia, acatalazemia, boala Refsum). Tulburările de biogeneză a peroxizomilor sunt datorate mutaţiilor ce survin în cele 11 gene implicate în formarea lor – familia de gene *PEX.*

Sindromul Zellweger (OMIM # 214100) este o boală letală, transmisă autozomal recesiv, care în forma clasică se manifestă prin: dismorfie cranio-facială (fontanele cu suturi larg deschise, occiput plat, hipertelorism, epicantus, anomalii ale pavilioanelor auriculare), disfuncţie neurologică gravă (hipotonie, surditate de percepţie şi cataractă sau corioretinopatie, convulsii), retard psihomotor, hepatosplenomegalie, icter colestatic (inconstant), chisturi renale şi retard somatic. Evoluţia este severă, cu deces în primul an de viaţă.

Condrodisplazia punctată rizomelică (OMIM # 215100) este o boală transmisă autozomal recesiv, datorată mutaţiilor din gena *PEX7*, ce se manifestă prin modificări scheletice (hipoplazie facială, proeminenţe frontale, membre foarte scurte cu puncte pe epifize, fisuri vertebrale), nări mici, cataractă, ihtioză şi retard psihomotor profund. Biochimic boala este caracterizată prin nivelul seric crescut de acid fitanic, nivelul scăzut de plasmalogen eritrocitar şi nivelul normal de acizi graşi cu lanţ foarte lung.

Adrenoleucodistrofia (OMIM # 202370) este cauzată de mutaţia genei *ABCD1*, localizată pe cromozomul X (Xq 28), care determină sinteza unei proteine peroxizomale – *ALDP* – implicată în metabolismul acizilor graşi saturaţi cu lanţ foarte lung. Boala se transmite recesiv legat de X, şi poate debuta în prima decadă de viaţă (forma gravă, cerebrală – 40% din pacienţi) sau la adolescenţi/adulţi tineri (forma medie numită *adrenomieloneuropatie* – 45% din pacienţi). Forma gravă se poate manifesta prin deficit de atenţie ce poate evolua până la tulburări de comportament, convulsii, şi insuficienţă corticosuprarenală. În evoluţia bolii se produce pierderea progresivă a vederii, a vorbirii şi demenţă. Suferinţa neurologică severă, caracteristică bolii, este expresia unui proces progresiv de demielinizare cerebrală, determinat de efectul citotoxic al acizilor graşi saturaţi, cu lanţ foarte lung. Forma medie se poate manifesta prin parapareză, perturbarea controlului sfincterian şi tulburări sexuale. Diagnosticul este confirmat prin demonstrarea valorilor crescute ale acizilor graşi cu lanţ foarte lung în plasmă sau fibroblaste.

Boala Refsum (OMIM # 266510) este transmisă autozomal recesiv şi este datorată deficitului de fitanoil-CoA-hidroxilază, ce duce la acumularea acidului fitanic. Debutul survine în decada a treia de viaţă, cu manifestări clinice ce constau în neuropatii periferice progresive, tulburări de auz, anosmie, cardiomiopatie cu tulburări de conducere, ihtioză şi nivel seric crescut de acid fitanic.

2. Boli produse prin anomalii ale proteinelor de transport

Deplasarea eficientă a moleculelor – spre interiorul celulelor, între diversele lor compartimente, precum şi între celule – necesită adeseori intervenţia unor macromolecule care *mediază* transportul lor. Circa o treime din totalul proteinelor care intră în structura diverselor membrane (ale celulelor sau ale diverselor organite) sunt implicate în procese de transport. La aceste procese participă însă şi unele proteine citoplasmatice sau proteine din spaţiul extracelular.

1. Proteinele de transport transmembranare pot fi împărţite în patru clase, primele două fiind implicate în difuziunea facilitată, iar ultimele două în transportul activ:

- *Proteinele de transport tip canal* realizează pori care permit unor molecule mici, ce corespund ca dimensiune şi încărcare electrică, să traverseze membrana respectivă. Astfel, *aquaporinele* permit moleculelor de apă să străbată membrana mult mai rapid decât o pot realiza acestea prin stratul fosfolipidic, iar *canalele ionice* mediază pasajul ionilor prin membrane. **Canalele ionice** sunt caracterizate prin trei proprietăţi: a) transportul realizat este extrem de rapid; b) sunt adeseori înalt selective pentru o anumită specie de ioni (fiind astfel clasificate în canale de sodiu, potasiu, clor, calciu sau canale cationice); c) majoritatea canalelor nu sunt permanent deschise, deschiderea lor fiind reglată fie prin legarea tranzitorie a unor liganzi (precum neurotransmiţători sau alte molecule de semnalizare – canale ligand-dependente), fie ca răspuns la schimbarea potenţialului electric de-a lungul membranei (canale voltaj-dependente). Majoritatea canalelor ionice sunt alcătuite din oligomeri ai unor subunităţi alfa identice sau omoloage care formează porii, alături de subunităţi beta şi uneori gamma, ce sunt implicate în reglarea funcţiei lor. În genomul uman există circa 260 de gene care codifică diverse subunităţi ale canalelor ionice.
- *Proteinele de transport tip cărăuş* („*carrier*") leagă specific anumite molecule la nivelul unei feţe a membranei şi apoi suferă o modificare conformaţională care permite moleculei să străbată membrana şi să fie eliberată pe faţa opusă. Asemenea proteine sunt implicate în transportul glucidelor, aminoacizilor, nucleozidelor etc. Există trei forme de transport mediat de proteinele cărăuş: *uniport* (transportul unei singure molecule prin difuziune facilitată), *cotransport* (transportul a două sau mai multe specii de molecule în aceeaşi direcţie) sau *antiport* (transportul a două sau mai multe specii de molecule în direcţii opuse). Ele nu utilizează nici o altă sursă de energie în afară de energia chimio-osmotică. Cele mai importante pentru patologia umană sunt proteinele din **familia SLC** („*solute carrier*"). În genomul uman există 259 de gene care codifică proteine ce aparţin acestei familii.
- *Pompele ionice* (precum pompa $Na^+ - K^+$) utilizează energia obţinută prin hidroliza ATP pentru deplasarea ionilor *împotriva* unor gradiente de concentraţie. Ele fac parte din familia transportorilor ATP-azici, codificaţi în genomul uman de 251 de gene.
- *Familia transportorilor ABC* (*ATP-binding cassette*) este astfel denumită datorită prezenţei unor domenii de legare a ATP, înalt conservate. Au fost identificate circa 50 de gene umane care codifică **transportori ABC**.

2. Proteinele de transport intracitoplasmatice sunt implicate în procese precum transportul oxigenului (hemoglobina), transportul asociat microtubulilor (dineina, dinactina şi kinezina) sau procesele de trafic ale structurilor membranare (clatrinele, miozinele, proteinele RAB şi proteinele SNARE).

3. Proteinele de transport plasmatice asigură deplasarea a diverşi compuşi între compartimentele organismului. Aşa sunt apolipoproteinele, transtiretina, ceruloplasmina etc.

Toate aceste categorii de proteine implicate în transportul unor molecule pot suferi modificări determinate de mutaţii ce produc boli monogenice (vezi tabelul 12.3).

Mutaţiile implicate în producerea unor boli ale proteinelor de transport pot determina fie pierdere de funcţie, fie câştig de funcţie.

- *Mutaţiile cu pierderea funcţiei* determină *boli recesive*, cum sunt fibroza chistică sau sindromul Bartter. În cazul proteinelor care formează complexe multimerice, acest tip de mutaţii pot avea însă *efecte dominant negative*. Este interesant de observat că, în funcţie de prezenţa sau absenţa efectelor dominant negative, mutaţii diferite la nivelul aceleiaşi gene pot determina fie boli recesive, fie boli dominante. Aşa este, de exemplu, cazul mutaţiilor *genei CLCN1* (care codifică canalul de clor de la nivelul muşchilor scheletici): unele mutaţii determină forma recesivă (tip Becker) de *miotonie congenitală*, alte mutaţii produc forma dominantă (tip Thomsen). În plus, formele recesive de boală pot prezenta simptome calitativ noi faţă de formele dominante; de exemplu, pacienţii heterozigoţi pentru mutaţii dominant negative ale *genei KCNQ1* (canalul de potasiu voltaj-dependent tip 1) prezintă **sindromul QT-lung** cu aritmii cardiace severe (sindromul Romano-Ward), în timp ce mutaţiile recesive care determină pierderea completă a funcţiei vor conduce la homozigoţi la asocierea aritmiilor cu surditatea congenitală (sindromul Jervell-Lange-Nielsen).
- *Mutaţiile cu câştig de funcţie* vor produce de obicei boli transmise dominant. Un exemplu îl constituie mutaţiile subunităţilor beta sau gamma ale canalului renal epitelial de sodiu (SCNN1B sau SCNN1G) implicate în producerea sindromului Liddle (pseudoaldosteronism).

Având în vedere numărul foarte mare de boli genetice care pot fi produse prin anomalii ale proteinelor de transport, trecerea lor în revistă depăşeşte scopul acestui capitol; de aceea, am realizat în tabelul 12.3 o sinteză a principalelor categorii şi tipuri mai frecvente de boli şi ne vom limita în cele ce urmează doar la prezentarea unui exemplu ilustrativ – fibroza chistică.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 12.3. Exemple de boli genetice produse prin mutații ale unor proteine de transport

Proteina	Gena	Localizarea cromozomială	Boala	OMIM
Boli prin mutații ale unor proteine canal				
Aquaporina 2	*AQP2*	12q13	Diabetul insipid nefrogen	* 107777
Subunitatea alfa a canalului de sodiu neuronal tip 1	*SCN1A*	2q24	Epilepsia generalizată cu crize comițiale febrile	* 182389
Subunitatea alfa a canalului de sodiu voltaj-dependent tip 4	*SCN4A*	17q23.1-q25.3	Paramiotonia congenitală	+ 603967
Subunitatea alfa a canalului de sodiu voltaj-dependent tip 5	*SCN5A*	3p21	Sindromul Brugada	* 600163
Subunitatea alfa a canalului de sodiu nonvoltaj-dependent tip 1	*SCNN1A*	12p13	Pseudohipoaldosteronismul tip 1	* 600228
Subunitățile beta/gamma ale canalului de sodiu nonvoltaj tip 1	*SCNN1B* *SCNN1G*	6p13-p12 6p13-p12	Sindromul Liddle	* 600760 * 600761
Canalul de potasiu voltaj-dependent, subfamilia KQT, membrul 1	*KCNQ1*	11p15.5	Sindromul Romano-Ward (AD) Sindromul Jervell-Lange-Nielsen (AR)	# 192500
Canalul de potasiu, subfamilia J, membrul 1	*KCNJ1*	11q24	Sindromul Bartter	* 600359
Canalul de potasiu voltaj-dependent, subfamilia ISK, membrul 3	*KCNE3*	11q13-q14	Paralizia periodică	* 604433
Canalul de calciu voltaj-dependent tip L, subunitatea alfa-1S	*CACNA1S*	1q32	Paralizia periodică hipokaliemică	* 114208
Canalul de clor tip 1 din mușchii scheletici	*CLCN1*	7q35	Miotonia Becker (AR) sau Thomsen (AD)	* 118425
Canalul de clor tip 7	*CLCN7*	16p13	Osteopetroza	* 602727
Boli prin mutații ale proteinelor din familia SLC				
Transportorul de glucoză tip 2	*SLC2A2*	3q26.1-q26.3	Sindromul Fanconi-Bieckel	# 227810
Transportorul pentru cistină, aminoacizi dibazici și neutri	*SLC3A1*	2p16.3	Cistinuria	# 220100
Schimbătorul de anioni tip 1/ proteina banda 3	*SLC4A1*	17q21-q22	Sferocitoza ereditară	# 182900
Cotransportorul sodiu-glucoză	*SLC5A1*	22q13.1	Malabsorbția pentru glucoză/galactoză	# 606824
Cotransportorul sodiu-iod	*SLC5A5*	19p13.2-p12	Hipotiroidia congenitală	# 274400
Transportorul ileal pentru sodiu și acizi biliari	*SLC10A2*	13q33	Malabsorbția primară a acizilor biliari	* 601295
Cotransportorul sodiu-clor	*SLC12A3*	16q13	Sindromul Gitelman	# 263800
Transportorul de urați	*SLC22A12*	11q13	Hipouricemia renală	# 220150
Transportorul ADP/ATP mitocondrial	*SLC25A4*	4q35	Oftalmoplegia externă progresivă cu deleții ale ADN mitocondrial	# 157640
Transportorul de citrină	*SLC25A13*	7q21.3	Citrulinemia tip II cu debut adult	# 603471
Transportorul de zinc	*SLC39A4*	8q24.3	Acrodermatita enteropatică	# 201100
Boli prin mutații ale proteinelor din familia ATPaze-lor				
Transportorul Na+-K+, subunitatea alfa 2	*ATP1A2*	1q21-q23	Migrena familială hemiplegică	# 602481
Transportorul rapid de Ca2+	*ATP2A1*	16p12	Miopatia Brody	# 601003
Transportorul lent de Ca2+	*ATP2A2*	12q23-q24.1	Boala Darrier	# 124200
Transportorul lizozomal de H+	*ATP6V0A4*	7q33-q34	Acidoza tubulară renală distală AR	# 602722
Transportorul de Cu2+, polipeptid beta	*ATP7B*	13q14.3-q21.1	Boala Wilson	# 277900
Transportorul de Cu2+, polipeptid alfa	*ATP7A*	Xq12-q13	Boala Menkes	# 309400

BCU CLUJ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Proteina	Gena	Localizarea cromozomială	Boala	OMIM
Boli prin mutații ale unor proteine din familia ABC				
Proteina ABC, subfamilia A, membrul 1	*ABCA1*	9q22-q31	Boala Tangier	# 205400
Proteina ABC, subfamilia A, membrul 4	*ABCA4*	1p21-p13	Boala Stargardt	# 248200
Proteina ABC, subfamilia B, membrul 11	*ABCB11*	2q24	Colestaza familială progresivă intrahepatică tip 2	# 601847
Proteina ABC, subfamilia C, membrul 2	*ABCC2*	10q24	Sindromul Dubin-Johnson	# 237500
Proteina ABC, subfamilia C, membrul 6	*ABCC6*	16p13.1	Pseudoxantoma elasticum AR sau AD	# 264800 # 177650
Proteina ABC, subfamilia C, membrul 7	*ABCC7*	7q31.2	Fibroza chistică	# 219700
Proteina ABC, subfamilia D, membrul 1	*ABCD1*	Xq28	Adrenoleucodistrofia	# 300100
Proteina ABC, subfamilia G, membrul 5	*ABCG5*	2p21	Sitosterolemia	# 210250
Proteina ABC, subfamilia G, membrul 8	*ABCG8*	2p21	Sitosterolemia	# 210250
Boli produse prin mutații ale proteinelor de transport intracitoplasmatice				
Hemoglobina beta	*HBB*	11p15.5	Hemoglobinopatia Kempsey	+ 141900
Dineina axonemală lanțul intermediar tip 1	*DNAI1*	9p21-p13	Sindromul Kartagener	# 244400
Dinactina 1	*DCTN1*	2p13	Boala Lower	# 607641
Kinezina 5A	*KIF5A*	12q13	Paraplegia spastică tip 10	# 604187
Kinezina 1B	*KIF1B*	1p36.2	Boala Charcot-Marie-Tooth tip 2A	# 118210
Proteina RAB27	*RAB27A*	15q21	Sindromul Griscelli	# 607624
Proteina RAB7	*RAB7*	3q21	Boala Charcot-Marie-Tooth tip 2B	# 600882
Proteina de escorta tip 1 a RAB	*REP1*	Xq21.2	Coroideremia	# 303100
Miozina tip VIIa	*MYO7A*	11q13.5	Sindromul Usher	# 276900
Boli produse prin mutații ale proteinelor de transport plasmatice				
Apolipoproteina E	*APOE*	19q13.2	Hiperlipoproteinemia tip III	+ 107741
Apolipoproteina B	*APOB*	2p24	Hipobetalipoproteinemia familială	+ 107730
Apolipoproteina C-II	*APOC2*	19q13.2	Hiperlipoproteinemia tip IB	# 207750
Transtiretina (prealbumina ce leagă tiroxina)	*TTR*	18q11.2-q12.1	Amiloidoza familială tip 1	* 176300
Ceruloplasmina	*CP*	3q23-q24	Aceruloplasminemia	# 604290

2.1. Fibroza chistică

Fibroza chistică sau mucoviscidoza (OMIM # 219700) este una dintre cele mai frecvente boli genetice cu transmitere autozomal recesivă din populația caucaziană, prevalența sa fiind estimată la aproximativ 1:2.500, iar incidența purtătorilor sănătoși (Na): la 1/25.

Simptomatologie. Principalele manifestări clinice ale bolii sunt determinate de afectarea plămânilor și a pancreasului exocrin. Afectarea acestor organe este rezultatul secrețiilor vâscoase ale glandelor exocrine care determină obstrucția structurilor canaliculare. La nivel pulmonar, aceasta determină infecții recurente cu evoluție spre insuficiență pulmonară, iar obstrucția canalelor pancreatice are drept consecință deficiența enzimelor pancreatice, cu afectarea digestiei. Un semn major pentru diagnostic este creșterea concentrației de sodiu și clor în secrețiile sudorale (peste 60 mEq/L). Alte manifestări clinice constau în ileusul meconial, la 10-25% dintre nou-născuții cu fibroză chistică, și absența congenitală bilaterală a vaselor deferente la băieți, în 95% dintre cazuri.

Genetică. Gena responsabilă de producerea bolii a fost identificată prin clonare în 1989 și denumită *CF* (de la *cystic fibrosis*). Analizele funcționale au demonstrat că proteina codificată de gena *CF* (denumită CFTR) acționează ca un *canal de clor* localizat

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

la nivelul polului apical al celulelor epiteliale afectate în cadrul acestei boli. Recent, gena *CF* a fost inclusă în familia genelor transportorilor ABC (cu casetă de legare a ATP), fiind desemnată ca *ABCC7*.

Frecvența crescută a heterozigoților în populația generală a condus la emiterea ipotezei că starea de heterozigot prezintă un avantaj selectiv; această ipoteză este susținută de descoperirea faptului că produsul proteic al genei *ABCC7* funcționează ca receptor pentru *Salmonella typhimurium* și este implicat în imunitatea împotriva infecțiilor cu *Pseudomonas aeruginosa*, deci heterozigoții sunt mai rezistenți la aceste infecții.

Gena *ABCC7* este localizată pe cromozomul 7q31 și conține 27 de exoni ce codifică o proteină canal transmembranar de clor alcătuită din cinci domenii funcționale: două transmembranare (MSD – *membrane spanning domains*), două domenii de legare a ATP (NBD – *nucleotide binding domains*) și un domeniu reglator (R) cu mai multe situsuri de fosforilare (figura 12.5). Prima mutație identificată a fost o deleție a trei nucleotide soldată cu absența aminoacidului fenilalanină din poziția 508 a proteinei (508delF). Această mutație este cea mai frecventă în populația caucaziană, reprezentând circa 70% dintre toate mutațiile. Au fost descrise însă numeroase alte mutații, deși doar șapte dintre ele au frecvențe care depășesc 0,5%. Frecvența lor în diferite populații este însă variată.

Astfel, mutația W1282X este prezentă la 51% dintre bolnavii din comunitatea evreilor aşkenazi, în timp ce mutația 1677delTA este întâlnită cu o frecvență crescută în Balcani și Asia Mică. În populațiile în care frecvența alelei 508delF este de aproximativ 70%, mai mult de jumătate dintre pacienți sunt homozigoți pentru această mutație, în timp ce alți 30% sunt heterozigoți compuși.

S-au descris șase clase de mutații ale genei *ABCC7*:

- mutațiile de clasa I conduc la defecte în producția proteinei; astfel de mutații sunt cele care determină apariția unor codoni stop sau a unor specii instabile de ARNm;
- mutațiile de clasa II (cum este, de exemplu, 508delF) au ca rezultat producerea unor defecte ale procesării proteinei (defecte de plicaturare);
- mutațiile de clasa III apar la nivelul domeniilor NBD sau R și produc dereglări ale activității proteinei;
- mutațiile de clasa IV sunt localizate la nivelul domeniilor MBD și alterează capacitatea de transport al clorului;
- mutațiile de clasă V reduc numărul de produși de transcripție;
- mutațiile de clasă VI determină proteine sintetizate normal, dar instabile la suprafața celulei.

Recent a fost descrisă o genocopie CF – mutații ale genei *SCNN1* pentru canalul de sodiu din epitelii,

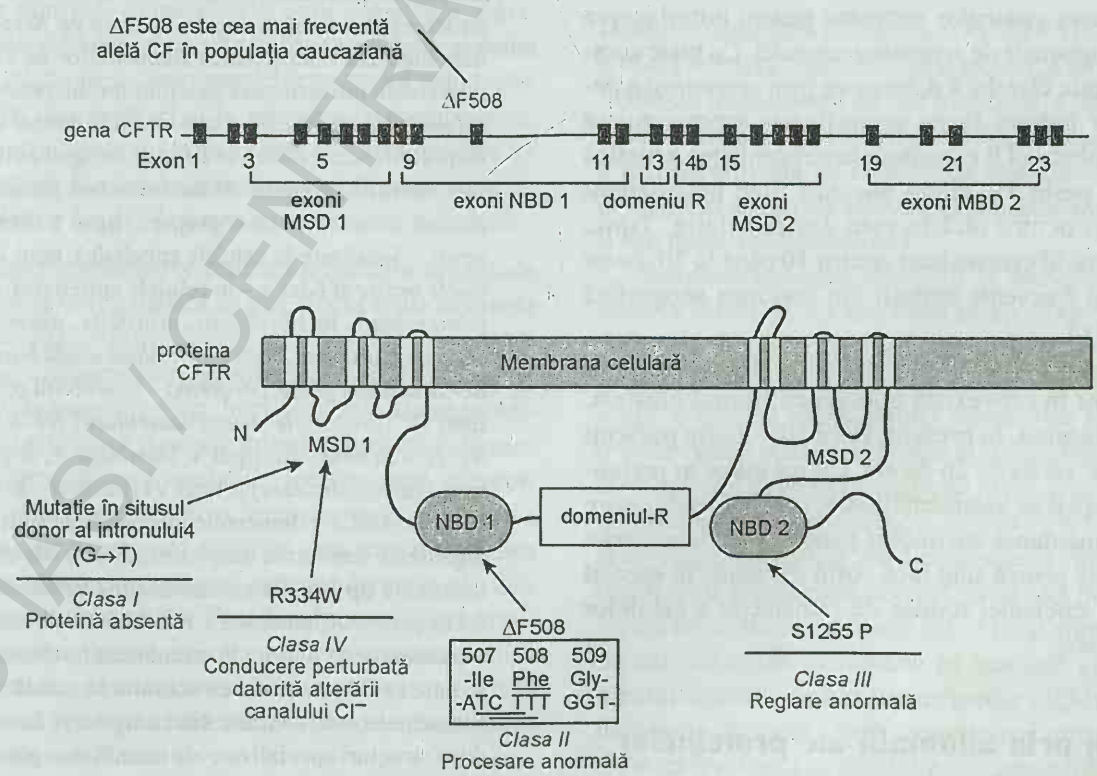


Figura 12.5. Structura genei CFTR, modelul schematic al proteinei CFTR și principalele clase de mutații din fibroza chistică

(după Nussbaum, McInnes și Willard, 2001)

BCU IASI / CENTRALA UNIVERSITARA

care determină infecţii pulmonare ca în fibroza chistică, afectare intestinală mai puţin severă şi nivel crescut de sodiu în transpiraţie. De fapt, canalul epitelial de sodiu interacţionează cu proteina CFTR, ceea ce explică tabloul asemănător.

Gradul crescut de heterogenitate clinică observat în cadrul bolii este determinat de heterogenitatea alelică, dar şi de intervenţia unor *gene modificatoare* sau a unor factori de mediu. S-a stabilit existenţa unei corelaţii între tipul mutaţiilor şi funcţia pancreatică. Astfel, mutaţiile nonsens care produc alele nule sau homozigozitate pentru mutaţia 508delF tind să se asocieze cu insuficienţa pancreatică, în timp ce mutaţiile care permit sinteza unei proteine parţial funcţionale – ca, de exemplu, R334W – nu alterează funcţia pancreatică. În schimb, la purtătorii aceleiaşi mutaţii există un grad crescut de variabilitate a alterării pulmonare. Severitatea manifestărilor pulmonare este dependentă de prezenţa sau absenţa unor gene modificatoarea *TGFα1, MBL2, NOS1*. De asemenea s-a identificat o genă modificatoare care influenţează apariţia ileusului meconial localizată pe cromozomul 19q13. În sfârşit, la pacienţii homozigoţi pentru alele care alterează doar într-o măsură redusă funcţia CFTR, singurul semn al bolii îl poate reprezenta doar absenţa congenitală bilaterală a vaselor deferente. Recent, s-a constatat că heterozigoţii pentru mutaţii CF pot avea o incidenţă crescută a pancreatitei şi bronşectaziei.

Screening neonatal. Fibroza chistică întruneşte majoritatea criteriilor necesare pentru introducerea sa în programele de *screening* neonatal. Cu toate acestea, nu este clar dacă detectarea prin *screening* a pacienţilor îmbunătăţeşte semnificativ supravieţuirea lor. Un obstacol îl constituie heterogenitatea genetică a bolii, peste 5% dintre pacienţi fiind heterozigoţi compuşi pentru alelele rare din populaţie. Tipic, *screening*-ul este realizat pentru 10 până la 30 dintre cele mai frecvente mutaţii din regiunea geografică respectivă.

Diagnosticul prenatal este indicat în special în cazul familiilor în care există bolnavi cu fibroză chistică.

Tratament. În prezent, circa 50% dintre pacienţi depăşesc vârsta de 26 de ani. Un rol major în prelungirea vieţii îl au tratamentul intensiv al bolii pulmonare şi suplimentarea enzimelor pancreatice. Încercările de terapie genică sunt încă puţin eficiente, în special datorită eficienţei reduse de transfecţie a celulelor pulmonare.

3. Boli prin anomalii ale proteinelor structurale

Proteinele structurale asigură forma şi organizarea caracteristice celulelor şi ţesuturilor. Se pot deosebi trei categorii majore de proteine structurale: proteine ale citoscheletului celular, proteine ale structurii membranare şi proteine structurale extracelulare.

- **Citoscheletul celular** este alcătuit din trei tipuri principale de proteine filamentoase: filamentele de actină, filamentele intermediare şi microtubulii, care sunt menţinute împreună şi ataşate la organitele celulare şi la membrana plasmatică printr-o varietate de proteine accesorii.

  Filamentele de actină sunt alcătuite în principal din monomeri de *actină G* (gamma) polimerizaţi sub forma unor filamente cu aspect dublu elicoidal. Aceste filamente se asociază cu o serie de proteine care au rol în organizarea în reţele a filamentelor de actină, precum *alfa-actinina, filamina, vilina* şi *fimbrina*. Filamentele de actină se ataşează şi la nivelul membranei celulare prin intermediul unor complexe proteice diferite în funcţie de tipul celular. Astfel, în cazul eritrocitelor, reţeaua filamentelor de actină este ataşată la nivelul *proteinelor bandă 3* membranare prin intermediul unor complexe proteice, ce conţin *spectrină, ankirină, proteină banda 4.1* şi *aducină*. Alte proteine din familia spectrinei sunt *distrofina* (în celulele musculare striate) sau *fodrina*. În plachete, *filamina* este echivalentul proteinei 4.1 eritrocitare, iar în celulele epiteliale *ezrina* ataşează filamentele de actină la CFTR. În sfârşit, filamentele de actină pot fi ataşate la o serie de structuri specializate ale membranei plasmatice, numite joncţiuni. Astfel, *talina, vinculina* şi *alfa-catenina* mediază ancorarea filamentelor de actină la *integrinele* din structura joncţiunilor focale, în timp ce *beta-cateninele* mediază interacţiunea filamentelor de actină cu *caderinele* din structura joncţiunilor aderente.
  Filamentele intermediare sunt alcătuite dintr-o varietate de proteine care diferă în funcţie de tipul celular. Au fost identificate peste 50 de asemenea proteine care au fost clasificate în 6 grupuri: tipul I (*keratinele acide* – localizate în celulele epiteliale), tipul II (*keratinele neutre* şi *bazice* – în celulele epiteliale), tipul III (*vimentina* – în fibroblaşti, eritrocite, *desmina* – în celulele musculare, *proteina fibrilară acidă bazică glială* – în celulele gliale, *periferina* – în neuronii periferici), tipul IV (*proteinele neurofilamentare*: *NF-L, NF-M, NF-H* – în neuroni), tipul V (*laminele A, B* şi *C* – în membranele nucleare) şi tipul VI (*nestina* – în celulele stem ale SNC). Filamentele intermediare sunt deseori organizate sub forma unor heterodimeri (de exemplu, keratinele tip I şi II sunt întotdeauna heterodimeri, la fel ca şi neurofilamentele). Filamentele de keratină şi vimentină sunt ataşate la membrana nucleară, având se pare rol în poziţionarea acestuia în celulă. În plus, filamentele intermediare sunt ataşate şi la nivelul a două structuri specializate ale membranei plasmatice: desmozomii şi hemidesmozomii.
  Microtubulii sunt alcătuiţi din două tipuri principale de proteine: *tubulinele alfa* şi *beta*. Ei sunţ implicaţi în realizarea structurilor caracteristice unor tipuri

celulare, cum sunt axonii celulelor nervoase, axonema flagelului spermatozoizilor sau banda marginală a plachetelor, precum şi în funcţionarea aparatului mitotic etc.

- **Proteinele de structură membranare** sunt implicate în adeziunea şi comunicarea intercelulară. Există cinci clase principale de proteine de adeziune intercelulară (CAMs – *cell adhesion molecules*): *caderinele* (precum *caderinele E, P şi N*), *superfamilia imunogobulinelor* (*N-CAM* şi *I-CAM*), *selectinele* (precum *selectina P*), *mucinele* şi *integrinele* (reprezentate de *integrinele alfa* şi *beta*). Deşi sute de asemenea proteine individuale sunt suficiente pentru a asigura adeziunea intercelulară, există şi o serie de aglomerări ale unor astfel de proteine care realizează structuri specializate în adeziunea intercelulară. Acestea sunt reprezentate de *joncţiunile aderente* (ce conţin *caderine E* alături de *cateninele alfa* şi *beta*), de *desmozomi* (alcătuite din *plakoglobină, desmogleină* – înrudită cu caderinele – şi *desmocolină*), *joncţiunile strânse* (alcătuite din *claudine* şi *ocludine*) şi *joncţiunile gap* (alcătuite din *conexine* – cu rol în comunicarea intercelulară).
- **Proteinele matricei extracelulare** au ca reprezentant principal *colagenul*, cea mai abundentă proteină animală. Se cunosc peste 30 de tipuri de colagen care sunt caracterizate prin formarea unor triplu helixuri. Alte componente proteice majore ale matricei extracelulare sunt *elastinele*, *fibrilinele* şi *fibronectina*, ultima fiind principala proteină de adeziune a componentelor ţesutului conjunctiv între ele, precum şi la integrinele membranare. Printre specializările matricei extracelulare se numără lamina bazală alcătuită dintr-o reţea de *colagen tip IV*, *laminină*, *perlecan* şi *enactină*.

Mutaţiile genelor ce codifică proteinele structurale determină boli genetice ce pot afecta toate organele şi sistemele. Printre clasele cele mai frecvente pot fi amintite *colagenozele, keratinopatiile, fibrilinopatiile, distrofiile musculare* etc. Întrucât multe dintre proteinele de structură descrise anterior formează homosau heteropolimeri, mutaţiile lor vor avea adeseori *efecte dominant negative*, ceea ce va conduce la o *transmitere dominantă* a bolilor. Aşa sunt majoritatea bolilor proteinelor matricei extracelulare sau ale filamentelor intermediare. Dată fiind asemănarea structurală şi funcţională a proteinelor din anumite familii (precum cea a colagenilor, keratinelor etc.), mutaţii la nivelul unor gene diferite pot produce boli genetice identice clinic.

De exemplu, în cazul **keratinopatiilor**, keratinopatia epidermolitică palmoplantară este determinată de mutaţii ale genelor *KRT1* şi *KRT9*; distrofia corneală Meesmann este determinată de mutaţii ale genelor *KRT3* şi *KRT12*, în timp ce pachionichia congenitală este determinată de mutaţii ale genelor *KRT6A*, *KRT6B*, *KRT16* şi *KRT17*.

Pe de altă parte, acest fenomen al heterogenităţii genetice de locus este asociat cu fenomenul invers, în care mutaţiile unei singure gene pot determina boli genetice diferite.

Astfel, mutaţiile *genei pentru lamina A* produc: distrofia musculară Emery-Dreifuss cu transmitere AD (OMIM # 181350), distrofia musculară a centurilor tip 1B (OMIM # 159001), cardiomiopatia dilatativă tip 1 (cu defect de conducere – OMIM # 115200), boala Charcot-Marie-Tooth tip 2B1 (OMIM # 605588), lipodistrofia familială parţială (OMIM # 151660) sau progeria Hutchinson-Gilford (OMIM # 176670).

În tabelul 12.4 am selectat exemplele cele mai reprezentative de boli monogenice produse prin anomalii ale unor proteine structurale, pentru a avea o informaţie preliminară privind complexitatea acestei categorii de boli, şi codurile OMIM, pentru obţinerea unor date suplimentare. În ceea ce urmează vom descrie câteva dintre cele mai frecvente boli din această categorie: distrofiile musculare Duchenne şi Becker, osteogenesis imperfecta, sferocitoza ereditară şi sindromul Ehlers-Danlos; sindromul Marfan a fost descris în capitolul 4 (vezi caseta 4.1).

3.1. Distrofia musculară Duchenne

Distrofia musculară Duchenne (OMIM # 310200) este o boală recesivă legat de X cu o incidenţă de circa 1 la 3.300 de nou-născuţi de sex masculin. Gena a cărei mutaţii determină distrofia musculară Duchenne, *DMD*, a fost identificată în 1986, fiind una dintre primele descoperiri majore ce au evidenţiat potenţialul pe care îl are medicina moleculară.

Simptomatologie. Pacienţii se dezvoltă normal până la vârsta de 3-5 ani, când încep să apară semne de hipotrofie (distrofie) musculară, manifestată predominant prin scăderea forţei musculare. Aceasta debutează la nivelul musculaturii membrelor inferioare (cu dificultăţi la alergat şi ulterior la urcatul scărilor, iar mai târziu cu pseudohipertrofia musculaturii gambei datorită înlocuirii muşchiului distrus cu ţesut fibros) şi evoluează ascendent, până ce afectează musculatura respiratorie şi determină decesul pacienţilor prin insuficienţă respiratorie sau cardiacă în jurul vârstei de 20 de ani. La aceste fenomene se asociază şi retardul mental moderat, cu o reducere medie a IQ-ului cu 20 de puncte. Semnul clinic caracteristic este manevra Gowers: pacientul se ridică din clinostatism în ortostatism sprijinindu-se pe genunchi („se caţără pe sine însuşi"). Forma **Becker** de distrofie musculară este determinată, de asemenea, de mutaţii ale genei pentru

Tabelul 12.4. Exemple de boli genetice produse prin mutații ale unor proteine de structură

Proteina	Gena	Localizarea cromozomială	Boala	OMIM
Boli prin mutații ale proteinelor citoscheletului celular				
Actina alfa cardiacă	*ACTC*	15q14.5	Cardiomiopatia idiopatică dilatativă	# 115200
Actina alfa scheletică	*ACTA*	1q42.1	Miopatia nemalinică tipul sever	# 256030
Filamina alfa	*FLNA*	Xq28	Heterotopia periventriculară	# 300049
Proteina 4.1 eritrocitară	*EPB41*	1p36.2-p34	Eliptocitoza ereditară	* 130500
Spectrina alfa eritrocitară	*SPTA1*	1q21	Eliptocitoza	* 182860
Spectrina beta eritrocitară	*SPTB*	14q22-q23.1	Eliptocitoza tip 3	+ 182870
Ankirina tip 1	*ANK1*	8p11.2	Sferocitoza ereditară	# 182900
Ankirina tip 2	*ANK2*	4q25-q27	Sindromul QT lung tip 4	# 600919
Distrofina	*DMD*	Xp21.2	Distrofia musculară Duchenne	# 310200
Titina	*TTN*	2q24.3	Distrofia musculară tibială tardivă	# 600334
Keratina tip 1	*KRT1*	12q13	Hiperkeratoza epidermolitică	# 113800
Keratina tip 5	*KRT5*	12q13	Epidermoliza buloasa simplex	# 131900
Keratina tip 9	*KRT9*	17q12-q21	Keratodermia epidermolitică palmoplantară	# 144200
Keratina tip 12	*KRT12*	17q12	Distrofia corneală Meesmann	# 122100
Desmina	*DES*	2q35	Miopatia legată de desmină	# 601419
Proteina fibrilară acidă glială	*GFAP*	17q21	Boala Alexander	# 203450
Proteina neurofilamentară ușoară	*NEFL*	8p21	Boala Charcot-Marie-Tooth tip 2E	# 607684
Lamina A	*LMNA*	1q21.2	Progeria Hutchinson-Gilford	# 176670
Emerina (proteina asociată laminelor)	*EMD*	Xq28	Distrofia musculară Emery-Dreifuss	# 310300
Proteina *tau* (asociată microtubulilor)	*MAPT*	17q21.2	Demența frontotemporală cu parkinsonism	# 600274
Boli produse prin mutații ale proteinelor de structură membranare				
Caderina E	*CDH1*	16q22.1	Cancerul gastric difuz familial	# 137215
Integrina beta 3	*ITGB3*	17q21.32	Trombastenia Glanzmann	+ 173470
Integrina beta 4	*ITGB4*	17q11-qter	Epidermoliza buloasă letală cu atrezie pilorică	# 226730
Desmoplakina	*DSP*	6p24	Keratoza palmoplantară striată	* 125647
Placofilina	*PKP1*	1q32	Displazia ectodermală	# 604536
Claudina 14	*CLDN14*	21q22.3	Surditate AR	+ 605608
Claudina 16	*CLDN16*	3q27	Hipomagneziemia primară	# 248250
Boli produse prin mutații ale proteinelor matricei extracelulare				
Colagenul tip I, alfa-1	*COL1A1*	17q21.31-q22	Osteogenesis imperfecta tip I-IV	# 166200 # 166220
Colagenul tip II, alfa-1	*COL2A1*	12q13.1-q13.2	Sindromul Stickler tip I	# 108300
Colagenul tip IV, alfa-3	*COL4A3*	2q36-q37	Sindromul Alport AR	# 203780
Colagenul tip V, alfa-2	*COL5A2*	2q31	Sindromul Ehlers-Danlos tip I-II	# 130000 # 130010
Colagenul tip VI, alfa-2	*COL6A2*	21q22.3	Distrofia musculară scleroatonică Ullrich	# 254090
Colagenul tip VII, alfa-1	*COL7A1*	3p21.3	Epidermoliza buloasă distrofică recesivă	# 226600
Colagenul tip IX, alfa-2	*COL9A2*	1p33-p32.2	Distrofia epifizeală multiplă tip 2	* 600204
Colagenul tip X, alfa-1	*COL10A1*	6q21-q22.3	Condrodisplazia metafizară tip Schmid	# 156500
Elastina	*ELN*	7q11.2	Stenoza aortică supravalvulară	# 185500
Fibrilina 1	*FBN1*	15q21.1	Sindromul Marfan	# 154700

BCU IAȘI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

Proteina	Gena	Localizarea cromozomială	Boala	OMIM
Fibrilina 2	*FBN2*	5q23-q31	Arahnodactilia contracturală congenitală Beals	# 121050
Laminina alfa-2	*LAMA2*	6q22-q23	Distrofia musculară congenitală cu deficit de merozină	* 156225
Laminina gamma-2	*LAMC2*	1q25-q31	Epidermoliza buloasă joncțională tip Herlitz	# 226700
Perlecanul	*HSPG2*	1p36.1	Displazia dissegmentală Silverman-Handmaker	# 224410

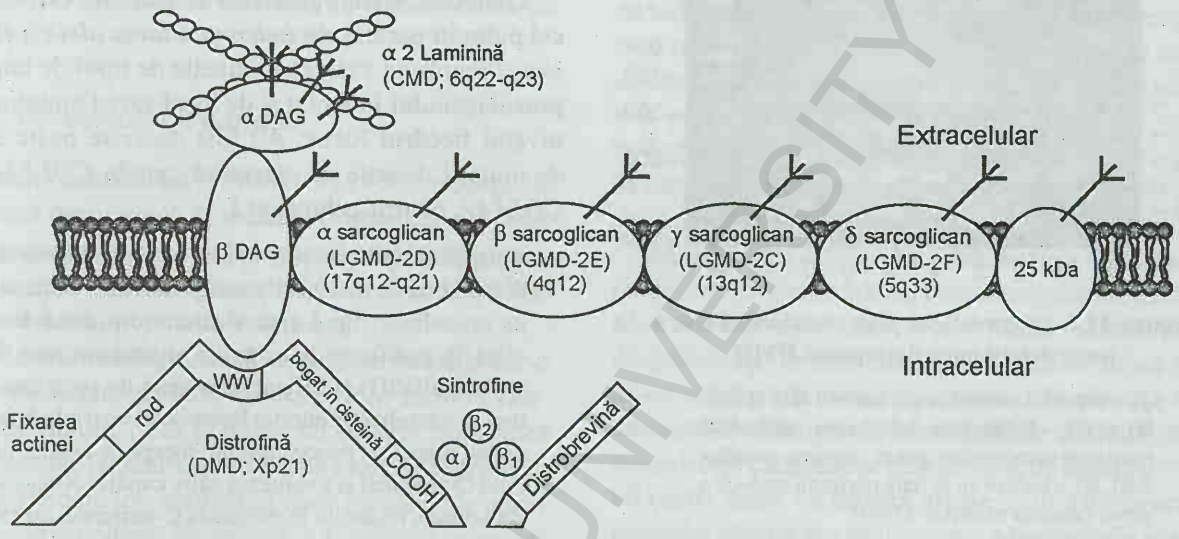


Figura 12.6. Rolul distrofinei

(după Nussbaum, McInnes și Willard, 2001)

Distrofina musculară mediază interacțiunea componentelor matricei extracelulare (laminina alfa-2) cu citoscheletul actinic. Ea interacționează cu un complex multimeric alcătuit din distroglican (DAG), sarcoglicani, sintrofine și distrobrevina.

distrofină (circa 15% dintre mutațiile acestui locus), dar manifestările clinice sunt mai puțin severe, iar supraviețuirea este mai îndelungată. Majoritatea femeilor purtătoare nu prezintă manifestări clinice, deși 70% dintre ele au niveluri crescute ale creatinkinazei serice. Inactivarea preferențială a cromozomului X purtător al mutației pare a contribui la absența manifestărilor clinice la femeile purtătoare. Există însă și cazuri (circa 8% dintre femeile heterozigote) când inactivarea cromozomului X interesează preferențial cromozomul X cu gena *DMD* normală, ceea ce determină hipotonie musculară semnificativă. Există chiar și cazuri rare de manifestări clinice complete la sexul feminin (în unele translocații X-autozomule sau în sindromul Turner).

Genetică. Gena *DMD* este cea mai mare genă umană, cu o lungime de peste 2 Mb, adică 1,5% din lungimea cromozomului X. Această lungime explică, cel puțin în parte, rata crescută a mutațiilor/locus (10^{-4}) comparativ cu alte gene.

Gena este alcătuită din 79 de exoni cu 7 promotori ce sunt responsabili de producerea de izoforme cu specificitate tisulară. Izoforma majoră este o proteină voluminoasă (427 kD) care predomină în mușchii scheletici, în miocard și în creier și îndeplinește două funcții majore: rol structural în menținerea integrității membranei (prin medierea interacțiunii între citoscheletul actinic și matricea extracelulară – vezi figura 12.6) și rol în funcționarea joncțiunilor sinaptice.

Cele mai frecvente mutații la pacienții cu distrofie musculară Duchenne sunt delețiile (60%), în marea lor majoritate fiind localizate în regiunea 59 sau în zona centrală a genei. Mutațiile punctiforme reprezintă circa o treime din cazuri și sunt răspândite pe întreaga lungime a genei. Circa o treime dintre cazurile de DMD sunt determinate de mutații *de novo*, în timp ce restul provin de la mame purtătoare ale mutației. Deoarece boala este letală, bărbații afectați nu transmit mutația. În cazul formei Becker de boală, capacitatea reproductivă este de circa 70%, iar bărbații bolnavi pot transmite mutația la fiicele lor. Ca urmare, o proporție însemnată din cazuri sunt moștenite în familie și doar 10% sunt determinate de mutații *de novo*.

Diagnosticul prenatal al DMD este posibil. În 60-70% din cazuri (determinate de deleții) defectul poate fi pus în evidență prin Southern blot sau prin PCR multiplex (figura 12.7) sau MLPA (multiplex

ligation-dependent probe amplification). În familiile în care mutația nu este cunoscută, se pot utiliza analizele de înlănțuire. De asemenea, identificarea femeilor purtătoare printre rudele unor băieți afectați se poate realiza cu succes în 75% din cazuri prin dozarea nivelului creatinkinazei serice.

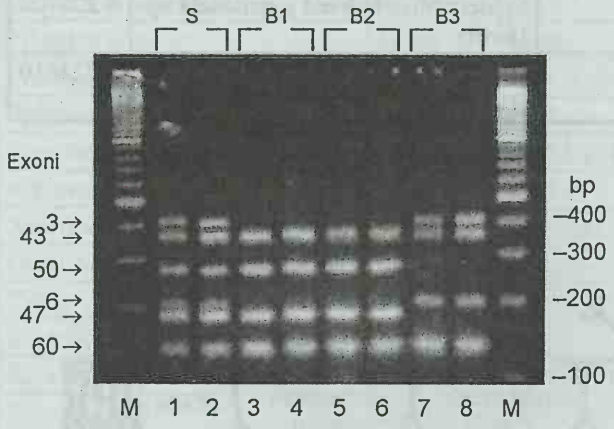


Figura 12.7. Diagnosticul prin multiplex PCR a unor deleții care determină DMD

S – aspectul normal la un individ fără deleții, B1 și B2 – bolnavi cu deleții care interesează porțiunea proximală a genei (absența exonilor 3-6), B3 – bolnav cu deleția porțiunii mijlocii a genei (absența exonilor 47-50)

Tratament. Singurul tratament utilizat este cel simptomatic. Există însă numeroase studii care încearcă să abordeze diverse alte metode de tratament (precum terapia genică) ce vor fi discutate în capitolul 19.

3.2. Osteogeneza imperfectă

Osteogeneza imperfectă (OMIM # 166200-166260) reunește un grup de boli transmise autozomal dominant, produse prin mutații ale colagenului tip I, ce determină predispoziție la deformații scheletice și fracturi osoase în urma unor traumatisme minime. Incidența lor cumulată este de circa 1 la 10.000 în populația generală.

Simptomatologie. Din punct de vedere clinic se deosebesc patru tipuri majore de boală. *Tipul I* de boală (forma ușoară)(50% din cazuri) se caracterizează prin asocierea fragilității osoase cu sclere albastre și eventual surditate presenilă; deformațiile scheletice sunt absente. *Tipul II* (sever) este letal în perioada neonatală și asociază fracturi osoase, deformații scheletice și sclere de culoare închisă. *Tipul III* asociază adeseori fracturi prezente la naștere cu deformații osoase progresive, hipostatură, sclere albastre, tulburări ale dentiției și surditate. În *tipul IV*, sclerele au aspect normal, deformațiile osoase sunt ușoare sau moderate, dar persistă susceptibilitatea la fracturi, surditate și anomalii ale dentiției. Recent au fost adăugate alte două tipuri clinice, V și VI, insuficient caracterizate genetic, precum și tipul VII, produs de mutații în gena *CRTAP* (codifică o proteină asciată cartilajului) și VIII, produs de mutații în gena *LEPRE1* (codifică enzima prolyl-3-hydroxylase-1).

Diagnosticul este bazat pe aspectul clinic și radiologic și poate fi confirmat prin analiza biochimică a colagenului (în fibroblaste recoltate prin biopsii de piele) și secvențiere genică.

Genetică. Heterogenitatea clinică este explicată, cel puțin în parte, prin *heterogenitatea alelică* și *de locus*: fenotipul variază în funcție de tipul de lanț al procolagenului I afectat și de localizarea mutației la nivelul fiecărui locus. Au fost descrise peste 200 de mutații diferite ce afectează genele *COL1A1* și *COL1A2*, pentru colagenul I.

Colagenul tip I este principala proteină structurală la nivelul osului și al altor țesuturi fibroase. Moleculele de procolagen tip I sunt alcătuite din două lanțuri alfa1(I), codificate de o genă de pe cromozomul 17, și un lanț alfa2(I) codificat de o genă de pe cromozomul 7. Asamblarea acestor lanțuri într-un triplu helix în cursul maturării procolagenului începe la nivelul capătului C-terminal și evoluează către capătul N-terminal. Ca urmare, mutațiile în porțiunea C-terminală au efecte mai severe. De asemenea, mutațiile la nivelul procolagenului alfa1(I) tind să aibă efecte mai severe decât mutațiile la nivelul procolagenului alfa2(I), datorită efectelor dominant negative (vezi figura 12.1).

Se pot deosebi două tipuri majore de mutații implicate în etiologia osteogenezei imperfecte: mutații ce determină reducerea producției de colagen tip I și mutații care determină sinteza unor molecule anormale structural. Reducerea cantității de colagen I sintetizate este consecința unor mutații care au un efect sever asupra proteinei codificate. Sunt implicate în special mutații cu apariția unor codoni stop prematuri, mici deleții sau inserții ce determină decalarea cadrului de lectură, sau mutații ale situsurilor de matisare. Aceste mutații interesează de regulă lanțurile alfa1(I) și sunt implicate în producerea tipului I de boală. Mutațiile care determină sinteza unor lanțuri proteice anormale, dar stabile, tind să aibă consecințe clinice mai severe și se asociază cu formele II-IV de boală.

Sfat genetic și diagnostic prenatal. Osteogenesis imperfecta se transmit predominent autozomal dominant, bolnavii având un risc de 50% de a avea copii afectați. Dar majoritatea cazurilor sunt mutații *de novo* și dintre aceste numai o mică parte rezultă printr-un mozaicism germinal (risc de recurență 6%). Mutațiile în genele *CRTAP* și *LEPRE1* se transmit autozomal recesiv, părinții având un risc de recurență de 25%. Diagnosticul prenatal este posibil prin testare genetică. Cunoștințele acumulate în înțelegerea efectelor pe

care diferite mutații le pot avea asupra structurii și funcției colagenului permit în oarecare măsură predicția istoricului natural al bolii, atunci când este identificată o mutație în cadrul activităților de diagnostic prenatal.

Tratamentul bolii consta în mare măsură, până nu de mult, numai în simpla corecție chirurgicală a efectelor fracturilor osoase. În prezent, se asociază cu succes biofosfonații, o clasă de compuși care reduc resorbția osoasă, crescând densitatea și conținutul mineral al acestora la pacienții cu forme severe de boală.

3.3. *Sferocitoza ereditară*

Sferocitoza ereditară (OMIM # 182900) este o boală genetică determinată de mutații ale unor gene ce codifică proteine de structură ale membranei eritrocitare. Frecvența bolii este apreciată a fi de circa 1 la 5.000 de indivizi în populația europeană.

Simptomatologie. Boala se caracterizează printr-o marcată heterogenitate clinică, de la forme cvasiasimptomatice până la forme cu anemie hemolitică fulminantă. Trăsătura morfologică a bolii este prezența microsferocitelor, rezultat al unor pierderi ale membranei eritrocitare. Se adaugă o fragilitate osmotică anormală *in vitro*. Sferocitele sunt eliminate rapid din circulație la nivelul splinei (hemoliză extravasculară). Ca urmare, splenomegalia este una dintre trăsăturile dominante ale bolii. Principalele complicații sunt aplazia sau criza megaloblastică, criza hemolitică, colecistita și colelitiaza, precum și hemoliza neonatală severă.

Genetică. Boala este transmisă de regulă autozomal dominant. În acest caz, indivizii bolnavi sunt heterozigoți pentru mutația cauzatoare a bolii, formele homozigote nefiind descrise (probabil sunt incompatibile cu viața). Circa 25% din cazuri, deși determinate de mutații dominante, nu au istoric familial pozitiv, fiind rezultatul unor mutații *de novo*. Transmiterea autozomal recesivă este întâlnită în circa 20-25% din cazuri. În această situație, indivizii bolnavi sunt homozigoți sau heterozigoți compuși. Dată fiind frecvența globală a bolii, se apreciază că frecvența heterozigoților pentru asemenea mutații în populația generală ar fi de circa 1,4%.

Etiologia bolii este heterogenă, până în prezent fiind descrise drept cauze mutațiile la nivelul a cinci gene: *ankirina 1* (*ANK1* – cromozomul 8p11.2) *spectrina beta* (*SPTB* – cromozomul 14q22-q22.3), *schimbătorul de anioni tip 1* sau proteina bandă 3 (gena *SLC4A1* – cromozomul 17q21-q22), *proteina 4.2* (gena *EPB42* – cromozomul 15q15), *spectrina alfa* (*SPTA1* – cromozomul 1q21).

Diagnosticul prenatal este posibil atunci când se cunosc mutațiile prezente în familie. *Sfatul genetic* nu este atât de simplu cum pare la prima vedere, datorită heterogenității genetice și mutațiilor noi.

Tratamentul substitutiv și splenectomia pot ameliora evoluția bolii.

3.4. *Sindromul Ehlers-Danlos*

Sindromul Ehlers-Danlos reunește un grup heterogen de boli genetice ale țesutului conjunctiv, caracterizate prin hipermobilitate articulară, extensibilitate tegumentară și fragilitate tisulară. Sindromul Ehlers-Danlos este probabil una dintre cele mai frecvente boli genetice ale țesutului conjunctiv, deși frecvența sa variază în limite foarte largi, între 1 la 5.000 și 1 la 50.000 de indivizi.

Manifestări clinice. În 1986, boala a fost clasificată clinic în tipurile I-VIII. Pentru majoritatea pacienților semnele sunt minore și ei rămân adeseori nediagnosticați. În contrast, tipul vascular (tipul IV) poate conduce la moarte prematură în absența tratamentului chirurgical. Manifestările cutanate sunt considerate cardinale și includ aspectul hiperextensibil (*cutix laxa*), cu textura moale, catifelată, apariția escarelor atrofice și a echimozelor. Manifestările articulare sunt prezente de asemenea în toate formele, putând ajunge până la dislocații ale șoldului în forma hipermobilă (tipul III) sau la artrocalazie (tip VIIA și VIIB). Cifoscolioza pronunțată este patognomonică pentru tipul VI de boală. Anomaliile oculare, precum keratoconusul, sclerele albastre, subluxația de cristalin sau dezlipirea retiniană, sunt prezente de asemenea în toate tipurile, dar au o severitate particulară în tipul VI. În sfârșit, ruptura prematură a membranelor și hemoragiile pre- sau postpartum sunt caracteristice în particular tipului clasic (I) sau vascular (IV) de boală.

Genetică. Sindromul Ehlers-Danlos se caracterizează prin heterogenitate genetică:

- Formele clasice de boală (tipurile I și II) sunt forme transmise dominant, determinate de mutații ale colagenului tip V (genele *COL5A1* și *COL5A2*) sau, mai rar, ale colagenului tip I (*COL1A1* – numai în tipul I).
- Tipul hipermobil (III) de boală este determinat de mutații ale colagenului tip III (*COL3A1*). Aceeași genă este implicată și în producerea formei vasculare (IV) de boală, dar mutațiile implicate sunt diferite, iar unele mutații produc fenotipuri mai severe decât altele.
- Tipul V de boală este caracterizat prin transmitere legată de X, dar defectul molecular al bolii nu a fost încă identificat.
- Tipul VI de boală asociază transmitere recesivă și este consecința mutației genei pentru lizil-hidroxilază (gena *PLOD*) implicată în modificarea posttranslațională a colagenurilor tip I și III.

- Tipurile VIIA şi VIIB sunt transmise dominant şi sunt determinate de mutaţii ale genelor care codifică colagenul tip I (*COL1A1* şi *COL1A2*). Tipul VIIC este transmis recesiv şi determinat de mutaţiile unei procolagen-proteinaze (gena *ADAMTS2*).
- Tipul VIII (cu periodontită) este transmis dominat şi înlănţuit cromozomului 12p13, dar defectul molecular al bolii nu a fost încă identificat.

4. Boli prin anomalii ale proteinelor implicate în comunicarea intercelulară şi controlul dezvoltării

Semnalizarea intercelulară este o componentă esenţială a vieţii organismelor multicelulare, având un rol esenţial în cursul dezvoltării embrionare, precum şi în coordonarea activităţii tuturor celulelor pe tot parcursul vieţii.

Semnalizarea implică molecule extrem de diverse, dar o bună parte dintre acestea sunt proteinele. Există mai multe categorii de proteine care intervin în semnalizarea intercelulară şi controlul dezvoltării: proteine care mediază comunicarea intercelulară directă, hormoni peptidici şi factori de creştere, receptori, proteine implicate în transducţia intracelulară a semnalelor şi factori de transcripţie. Toate aceste proteine funcţionează în una din cele şapte căi majore de semnalizare identificate la organismele superioare şi om: calea WNT (*Wingless* – „fără aripi"), calea TGF-β (factorul de transformare a creşterii beta), calea HH (*Hedgehog* – „arici"), calea RTK (receptor tirozin kinazic), calea JAK/STAT (Janus kinaza/transductor al semnalului şi activator al transcripţiei), calea Notch („*crestătura*") şi calea receptorilor nucleari.

- **Proteinele implicate în semnalizarea intercelulară directă** alcătuiesc unele structuri precum *joncţiunile gap* (formate din *conexine*) care permit schimbul rapid al unor molecule mici. De asemenea, *integrinele* şi *caderinele* funcţionează şi ca molecule de semnalizare a interacţiunilor intercelulare.
- **Hormonii peptidici şi factorii de creştere** sunt molecule esenţiale de semnalizare la distanţă. Exemple cunoscute de *hormoni peptidici* sunt insulina, glucagonul şi hormonii hipofizari (hormonul de creştere, FSH, LH, prolactina etc.), la care se adaugă şi o serie de *neurohormoni* (endorfinele sau enkefalinele) care pot acţiona atât la distanţă, cât şi ca neurotransmiţători la nivelul sinapselor neuronale. *Factorii de creştere* includ o largă varietate de molecule de semnalizare care controlează creşterea şi diferenţierea celulelor animale: NGF (factorul de creştere neuronal), EGF (factorul de creştere epidermală), PDGF (factorul de creştere al plachetelor) etc. Un alt grup larg de factori de creştere polipeptidici sunt *citokinele* care controlează creşterea şi diferenţierea celulelor sangvine.
- **Receptorii** pot fi localizaţi intracelular (receptorii pentru hormonii steroizi, tiroxina, acidul retinoic etc.), dar majoritatea lor sunt localizaţi la nivelul membranei plasmatice. În funcţie de caracteristicile structurale receptorii membranari pot fi clasificaţi în patru clase majore: receptori cuplaţi cu proteinele G (receptorii pentru epinefrină, serotonină sau glucagon), receptori – canale ionice (receptorul acetilcolinic), receptori asociaţi unor tirozin kinaze (receptorii pentru majoritatea citokinelor, interferoni şi hormonul de creştere) şi receptori cu activitate enzimatică intrinsecă (receptorii pentru insulină, EGF, PDGF, TGF-beta etc.). Receptorii pot fi clasificaţi de asemeni în funcţie de tipul de ligand în receptori hormonali, receptori ai citokinelor sau clase speciale de receptori, cum sunt cei ai unor metaboliţi (LDL) sau receptorii pentru lumină etc.
- **Proteinele implicate în transducţia semnalului** pot fi clasificate în trei clase principale: proteine cu activitate GTP-azică (proteinele trimerice G ataşate direct unor receptori şi proteinele monomerice din familia RAS), proteine care reglează fosforilarea (protein kinaze şi protein fosfataze) şi proteine adaptor (care nu au activitate catalitică proprie, dar mediază interacţiunea altor proteine prin intermediul unor domenii de legare ca, de pildă, domeniile SH2 ale proteinelor STAT ce leagă grupările fosfotirozinice ale altor proteine).
- **Factorii de transcripţie** au fost descrişi pe larg în capitolul 4. Ei pot fi clasificaţi în funcţie de conformaţia tridimensională în mai multe clase: proteine cu „degete de zinc", proteine cu „fermoare leucinice", proteine homeodomeniu etc. Multe dintre acestea au un rol esenţial în controlul dezvoltării în perioada embrionară.

Mutaţiile genelor ce codifică proteine implicate în semnalizarea intercelulară şi în controlul dezvoltării sunt extrem de numeroase în patologia umană. Pentru a avea o vedere „panoramică" asupra acestei categorii de boli moleculare, în tabelul 12.5 am inclus câteva dintre cele mai frecvente clase şi boli monogenice produse prin mutaţii ale unor asemenea proteine, precizând codul OMIM prin care doritorii pot obţine informaţii suplimentare. Ele sunt grupate în următoarele categorii:

- boli produse prin anomalii ale unor proteine implicate în semnalizarea intercelulară directă;
- boli produse prin anomalii ale unor hormoni şi factori de creştere;
- boli produse prin anomalii ale unor receptori;
- boli produse prin anomalii ale unor proteine implicate în transducţia semnalului;
- boli produse prin anomalii ale unor factori de transcripţie.

În rest, ne vom limita la descrierea a două dintre cele mai frecvente boli genetice: hipercolesterolemia familială, determinată de mutaţii ale receptorului LDL şi boala polichistică renală a adultului (ADPKD),

Tabelul 12.5. Exemple de boli monogenice produse prin anomalii ale unor proteine implicate în semnalizarea intercelulară şi controlul dezvoltării

Proteina	Gena	Localizare cromozomială	Boala	OMIM
Boli produse prin mutaţii ale unor proteine implicate în semnalizarea intercelulară directă				
Conexina 26	*GJB2*	13q11-q12	Surditatea neurosenzorială nonsindromică AR	# 220290
Conexina 30	*GJB6*	13q12	Displazia ectodermală hidrotică	# 129500
Conexina 31	*GJB3*	1p35.1	Eritrokeratodermia variabilă	# 133200
Conexina 32	*GJB1*	Xq13.1	Boala Charcot-Marie-Tooth legată de X	# 302800
Conexina 43	*GJA1*	6q21-q23.2	Displazia oculodentodigitală	# 164200
Conexina 46	*GJA3*	13q11	Cataracta zonulară pulverulentă	# 601885
Boli produse prin mutaţii ale unor hormoni şi factori de creştere				
Hormonul de creştere	*GH1*	17q22-q24	Deficit izolat al hormonului de creştere tip IA	# 262400
Hormonul paratiroidian	*PTH*	11p15.3-p15.1	Hipoparatiroidismul familial izolat AD	# 146200
Insulina	*INS*	11p15.5	Hiperproinsulinemia familială	+ 176730
Hormonul antimullerian	*AMH*	19p13.3-p13.2	Sindromul de persistenţă al ductelor mulleriene tip I	# 261550
Arginin vasopresina	*AVP*	20p13	Diabetul insipid central familial	# 125700
Proopiomelanocortina	*POMC*	2p23.3	Obezitate, insuficienţă adrenaliană, păr roşcat	* 176830
Peptidul insulin-like tip 3	*INSL3*	19p13.2	Criptorhidismul idiopatic	# 219050
Factorul de creştere fibroblastică tip 14	*FGF14*	13q34	Ataxia cerebelară AD	* 601515
Factorul de creştere al celulelor endoteliale derivat din plachete	*ECGF1*	22q13.32-qter	Sindromul encefalomiopatiei mioneuro-gastrointestinale	# 603041
Factorul indus de TGF-beta	*TGIF*	18p11.3	Holoprosencefalia tip 4	# 142946
Boli produse prin mutaţii ale unor receptori				
Receptorul androgenic	*AR*	Xq11-q12	Sindromul Morris	# 300068
Receptorul pentru vitamina D	*VDR*	12q12-q14	Rahitismul vitamino-D rezistent tip IIA	# 277440
Receptorul pentru factorul de creştere	*GHR*	5p13-p12	Sindromul Laron	# 262500
Receptorul pentru hormonul paratiroidian	*PTHR1*	3p22-p21.1	Condrodisplazia metafizeală tip Murk Jansen	# 156400
Receptorul pentru insulină	*INSR*	19p13.2	Diabetul zaharat insulino-rezistent cu *acanthosis nigricans*	# 610549
Receptorul pentru aldosteron	*HR3C2*	4q31.1	Pseudohipoaldosteronismul tip I	# 177735
Receptorul pentru hormonul luteinizant/coriogonadotropina	*LHCGR*	2p21	Pubertatea masculină precoce familială	# 176410
Receptorul pentru lipo-proteinele cu densitate joasă	*LDLR*	19p13.2	Hipercolesterolemia familială	# 143890
Membrul 1A al superfamiliei receptorilor pentru TNF	*TNFR5F1A*	12p13.2	Febra periodică familială AD	# 142680
Receptorul tip 1 pentru factorul de creştere fibroblastică	*FGFR1*	8p11.2-p11.1	Sindromul Kallmann tip 2	# 147950
Receptorul tip 2 pentru factorul de creştere fibroblastică	*FGFR2*	10q26	Sindromul Crouzon Sindromul Apert Sindromul Pfeiffer Cutis gyrata Sindromul Jackson-Weiss	# 123500 # 101200 # 101600 # 123790 # 123150
Receptorul tip 3 pentru factorul de creştere fibroblastică	*FGFR3*	4p16.3	Acondroplazia Displazia tanatoforică	# 100800 # 187600
Lanţul gamma al receptorului pentru interleukina tip 2	*IL2RG*	Xq13	Sindromul de imunodeficienţă combinată severă (SCID) legată de X	# 300400

Proteina	Gena	Localizare cromozomială	Boala	OMIM
Polipeptidul alfa-1 al receptorului colinergic nicotinic	*CHRNA1*	2q24-q32	Sindromul miastenic congenital	# 601462
Polipeptidul alfa-4 al receptorului colinergic nicotinic neuronal	*CHRNA4*	20q13.2-q13.3	Epilepsia nocturnă de lob frontal tip 1	# 600513
Rodopsina	*RHO*	3q21-q24	Retinita pigmentară	* 180380
Boli produse prin mutații ale unor proteine implicate în transducția semnalului				
Subunitatea alfa stimulatorie a proteinei de legare a GDP	*GNAS*	20q13.2	Pseudohipoparatiroidismul tip IA Osteodistrofia ereditară Albright	# 103580
Polipeptidul 1 cu activitate alfa transductoare a proteinei G	*GNAT1*	3p21	Cecitatea nocturnă congenitală staționară	# 610444
Polipeptidul 2 cu activitate alfa transductoare a proteinei G	*GNAT2*	1p13	Acromatopsia	+ 139340
Neurofibrina	*NF1*	17q11.2.	Neurofibromatoza 1	# 162200
Proteina STAT tip 1	*STAT1*	2q32.2-q32.3	Infecția familială diseminată cu micobacterii atipice	# 209950
Janus kinaza tip 3	*JAK3*	19p13.1	SCID AR tip T negativ/B pozitiv	# 600802
Serin treonin kinaza tip 11	*STK11*	19p13.3	Sindromul Peutz-Jeghers	# 175200
Boli produse prin mutații ale unor factori de transcripție				
Proteina de legare la CREB	*CREBBP*	16p13.3	Sindromul Rubinstein-Taybi	# 180849
Omologul 2 al proteinei „empty spiracles" de la *Drosophila*	*EMX2*	10q26.1	Schizencefalia	# 269160
Membrul 3 al familiei proteinelor Gli-Kruppel	*GLI3*	7p13	Cefalosinpolidactilia (sindromul Grieg) Sindromul Pallister-Hall Polidactilia postaxială tip A1	# 175700 # 146510 # 174200
Proteina homeobox A11	*HOXA11*	7p15-p14.2	Sinostoza radioulnară cu trombocitopenie amegacariocitică	# 605432
Proteina homeobox A13	*HOXA13*	7p15-p14.2	Sindromul mână-picior-organe genitale	# 140000
Proteina homeobox D13	*HOXD13*	2q31-q32	Sinpolidactilia	# 186000
Proteina Lim homeobox 1 beta	*LMX1B*	9q34.1	Sindromul unghii-rotulă	# 161200
Factorul de transcripție asociat microftalmiei	*MITF*	3p14.1-p12.3	Sindromul Waardenburg tip IIA	# 193510
Omologul 1 al genei homeobox din segmentul muscular de la *Drosophila*	*MSX1*	4p16.1	Hipodonția autozomal dominantă	# 106600
Omologul 2 al genei homeobox din segmentul muscular de la *Drosophila*	*MSX2*	5q34-q35	Craniosinostoza tip Boston	# 604757
Proteina „paired box" tip 2	*PAX2*	10q24.3-q25.1	Sindromul hipoplazie renală-colobom	# 120330
Proteina „paired box" tip 3	*PAX3*	2q35	Sindromul Waardenburg tip 1	# 193500
Proteina „paired box" tip 6	*PAX6*	11p13	Aniridia	# 106210
Proteina „paired box" tip 8	*PAX8*	2q12-q14	Disgenezia tiroidiană	# 218700
Proteina „paired box" tip 9	*PAX9*	14q12-q13	Oligodonția	# 604625
Proteina „paired like" tip 2	*PITX2*	4q25-q26	Sindromul Rieger	# 180500
Proteina „sal like" tip 1	*SALL1*	16q12.1	Sindromul Townes-Brocks	# 107480
Proteina „sonic hedgehog"	*SHH*	7q36	Holoprosencefalia tip 3	# 142945
Proteina SRY-box tip 9	*SOX9*	17q24.3-q25.1	Displazia campomelică	# 114290
Proteina SRY-box tip 10	*SOX10*	22q13	Sindromul Waardenburg-Shah	# 277580
Proteina T-box tip 3	*TBX3*	12q24.1	Sindromul mamaro-ulnar	# 181450
Proteina T-box tip 5	*TBX5*	12q24.1	Sindromul Holt-Oram	# 142900
Proteina Treacher-Collins 1	*TCOF1*	5q32-q33.1	Sindromul Treacher-Collins	# 154500
Proteina WT1	*WT1*	11p13	Sindromul Denys-Drash Sindromul Frasier	# 194080 # 136680

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

produsă prin mutații ale unor gene implicate în semnalizarea celulară. În plus, neurofibromatozele tip 1 și 2 vor fi discutate în capitolul 17.

4.1. Hipercolesterolemia familială

Definiție. Hipercolesterolemia familială (HF) (OMIM # 143890) este o boală transmisă autozomal dominant, determinată de mutații ale receptorului membranar pentru LDL, responsabil de legarea și internalizarea LDL, principala proteină de transport a colesterolului plasmatic.

Incidență. Forma homozigotă de boală este rară, cu incidența de 1 la un milion, dar forma heterozigotă reprezintă una dintre cele mai frecvente boli monogenice, cu o frecvență de cel puțin 1 la 500[2]. Se consideră ca până la 5% din indivizii cu hipercolesterolemie din populația generală sunt heterozigoți pentru o mutație *LDLR*.

Simptomatologie. Hipercolesterolemia familială este încadrată împreună cu alte boli în categoria hiperlipoproteinemiilor tip 2, fiind caracterizată prin creșterea LDL plasmatic și dezvoltarea *prematură* a plăcilor de aterom la nivelul arterelor (care determină boală coronariană precoce), a xantoamelor (depozite de colesterol la nivelul tegumentelor și tendoanelor) și arcurilor corneene (depozite de colesterol la periferia corneei). Simptomatologia clinică este prezentă atât la heterozigoți, cât și la homozigoți, dar manifestările clinice sunt mult mai severe și apar mai precoce la homozigoți („efect de dozaj genic"), care prezintă boală coronariană semnificativă încă din copilărie și decedează înainte de 30 de ani.

Patogenie. Colesterolul este un component lipidic esențial al membranelor și precursor al hormonilor steroidieni și al sărurilor biliare. Principala formă de transport a colesterolului plasmatic este LDL (*low density lipoprotein*). Receptorul pentru LDL (LDLR) recunoaște apoproteina B-100, principala componentă proteică a LDL, precum și apo E, o proteină prezentă în VLDL, IDL și chilomicroni. LDLR este localizat la nivelul unor zone ale suprafeței celulare care au aspectul unor mici depresiuni, îmbrăcate pe fața internă cu proteina *clatrină*. Legarea Apo B-100 determină internalizarea complexului LDL-receptor (endocitoză) și, după cuplarea cu endozomii, are loc eliberarea colesterolului liber în citoplasmă și reciclarea receptorului, care va reveni la nivelul membranei. Colesterolul care nu este necesar pentru metabolismul celular sau sinteza membranei poate fi reesterificat și stocat sub formă de esteri colesteril. Creșterea colesterolului intracelular reduce sinteza de receptor.

LDLR are cinci domenii funcționale (figura 12.8): domeniul de legare la LDL, un domeniu de omologie cu EGF (factorul de creștere epidermală) necesar pentru disocierea receptorului, cuplat la LDL, la nivelul endosomilor și reciclarea lui, un domeniu bogat în oligozaharide a cărui funcție nu este bine cunoscută, un domeniu transmembranar și un domeniu-țintă pentru regiunile membranei plasmatice îmbrăcate cu clatrină.

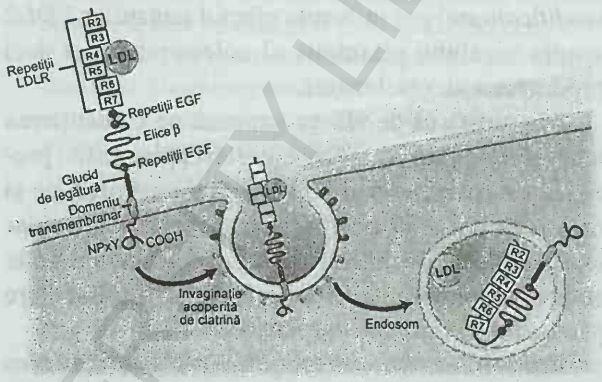


Figura 12.8. Internalizarea LDL prin endocitoză mediată de LDLR

Genetică. Așa cum am precizat, HF se transmite ereditar autozomal dominant; bolnavii sunt de obicei heterozigoți, dar – datorită frecvenței crescute a bolii – se pot întâlni și homozigoți, care fac mai precoce o formă gravă de boală, dovedind existența unui clar efect de dozaj genic (numărul de receptori LDL fiind mult mai redus decât la heterozigoți).

Au fost descrise peste 900 de mutații ale genei *LDLR* care sunt localizate pe toată lungimea genei. Circa 2-10% din totalul alelelor mutante din populație sunt reprezentate de deleții sau inserții mari, iar restul mutațiilor sunt substituții nucleotidice, deleții sau inserții mici. În unele populații cu o mare prevalență a bolii există de obicei o mutație frecventă, din cauza *efectului de fondator*. Din punct de vedere al consecințelor pe care le au asupra funcției receptorului se pot deosebi cinci clase de mutații:

- Mutațiile de clasa 1 sunt mutații care împiedică sinteza oricărei proteine și sunt determinate de deleții ori mutații care alterează stabilitatea ARNm. Ele sunt cele mai frecvente mutații la nivelul acestui locus.
- Mutațiile de clasa 2 sunt relativ frecvente și alterează capacitatea de plicaturare corectă a proteinei, ceea ce împiedică transportul său de la nivelul reticulului endoplasmatic la nivelul aparatului Golgi și acumularea sa la nivelul primului sediu.
- Mutațiile de clasa 3 sunt compatibile cu localizarea membranară a receptorului, dar determină incapacitatea de legare a LDL.
- Mutațiile de clasa 4 afectează localizarea corectă a receptorului în regiunile membranare îmbrăcate în

2. Frecvența crescută a HF s-ar putea explica prin avantajul selectiv al heterozigoților la anumite boli infecțioase (de exemplu, hepatita).

clatrină şi, ca urmare, complexul receptor-LDL nu poate fi internalizat.
- În sfârşit, mutaţiile de clasa 5 interesează domeniul de omologie cu EGF şi, ca urmare, alterează capacitatea de reciclare a receptorului.

Factorii de mediu (în special alimentaţia bogată în colesterol şi acizi graşi saturaţi), sexul masculin şi fondul genetic individual (în care se pot găsi *gene modificatoare*) pot influenţa efectul mutaţiilor *LDLR* asupra nivelului plasmatic al colesterolului şi deci producerea aterosclerozei.

Diagnosticul de HF se bazează pe evidenţierea unui nivel crescut de LDL-colesterol plasmatic, prezenţa xantoamelor sau bolii coronariene precoce şi un istoric familial pozitiv. Diagnosticul molecular este dificil datorită numărului mare de mutaţii diferite ce produc boala şi nu aduce informaţii suplimentare pentru prognostic sau tratament.

Tratament. Obiectivul principal este scăderea importantă a nivelului LDL-colesterolului plasmatic prin dieta săracă în grăsimi şi tratament hipocolesterolemiant cu statine, ce inhibă HMG-CoA reductaza şi determină stimularea expresiei alelei *LDLR* normale.

4.2. Boala polichistică renală autozomal dominantă

Boala polichistică renală a adultului (ADPKD) este o boală multisistemică ereditară, produsă de mutaţii dominante ale unor gene autozomale, manifestată de obicei la adult şi caracterizată prin chişti renali multipli, bilaterali, care se asociază variabil cu anomalii extrarenale, îndeosebi hepatice şi cardiovasculare. ADPKD este una din cele mai frecvente boli ereditare la om, având o prevalenţă de circa 1 la 1.000.

Manifestările clinice ale ADPKD: debutează de obicei în a treia - a patra decadă de viaţă, dar chiştii pot fi depistaţi încă din copilărie, fiind mult timp asimptomatici. Atunci când ating anumite dimensiuni, boala poate fi sugerată de dureri lombare şi nefromegalie. Manifestările extrarenale sunt reprezentate de chişti hepatici, hipertensiune arterială (secundară ischemiei renale), prolaps de valvă mitrală, anevrisme intracraniene. Boala evoluează frecvent spre insuficienţă renală cronică (IRC) terminală, necesitând terapie de supleare a funcţiei renale.

Diagnosticul pozitiv este de obicei uşor la adult: rinichi mari (bilateral) cu chişti multipli, prezenţa chiştilor în ficat, anamneza familială pozitivă şi sugestivă pentru transmiterea autozomală dominantă. Existenţa altor boli chistice renale – genetice sau negenetice – impune un *diagnostic diferenţial* atent, mai ales în două situaţii: copil cu boală chistică renală, situaţie în care pentru a stabili dacă este vorba de ADPKD sau ARPKD se va determina prezenţa sau absenţa bolii la unul dintre părinţi; alte boli renale chistice cu transmitere autozomal dominantă, cum ar fi boala renală glomerulochistică sau scleroza tuberoasă.

Genetică. Boala polichistică renală a adultului este o boală ereditară cu transmitere autozomal dominantă, penetranţă dependentă de vârstă şi expresivitate variabilă manifestă prin anomalii renale şi extrarenale variate la bolnavi diferiţi. Prin studii familiale şi moleculare de înlănţuire genică au fost identificate, la diferite familii cu ADPKD, trei gene: *PKD1* (prezentă la circa 85% din bolnavi), *PKD2* (15% bolnavi) şi *PKD3* (în câteva familii).

- Gena *PKD1* a fost localizată pe cromozomul 16p13.3 şi secvenţializată, stabilindu-se că regiunea codantă (alcătuită din 46 exoni) codifică o glicoproteină membranară multifuncţională, numită *policistina 1,* care ar putea avea un rol în interacţiunea celulă-celulă sau celulă-proteine din matricea extracelulară, funcţionând ca un *receptor*.
- Gena *PKD2* a fost localizată în regiunea 4q21-22 şi secvenţializată. Regiunea codantă are numai 15 exoni, codificând o proteină membranară, cu numai 968 de aminoacizi, numită *policistina 2* care funcţionează probabil ca un *canal de calciu.*
- Gena *PKD3*. S-au descris câteva familii cu ADPKD la care boala nu este determinată de mutaţii în genele *PKD1* sau *PKD2*. Gena *PKD3* nu a fost încă localizată.

Patogenie. Date recente susţin implicarea patogenică a *cilului primar*. Proteinele codificate de genele *PKD* – policistinele 1 şi 2 – sunt localizate în cilul primar al celulelor epiteliale de la nivelul tubilor renali. Fluxul intraluminal de fluide produce îndoirea cililor primari, care funcţionând ca nişte mecano-senzori, stimulează complexul PC1/PC2 ce activează sau inhibă o serie de căi de semnalizare responsabile de menţinerea structurii normale a nefronului. Ca urmare, defecte în formarea cililor, sinteza proteinelor ciliare sau perturbarea căilor de semnalizare intracelulare produc hiperproliferare celulară şi hipersecreţie de fluide ce conduc la dezvoltarea chiştilor renali. Policistinele 1 şi 2 mai sunt situate şi la nivelul joncţiunilor celulă-celulă şi celulă-matrice, iar PC2 mai este localizată şi la nivelul reticulului endoplasmatic şi a fusului mitotic. Defectele policistinelor la aceste nivele explică apariţia manifestărilor extrarenale ale bolii polichistice.

Ipoteza patogenică descrisă mai sus nu explică una din caracteristicile fundamentale ale ADPKD: deşi toate celulele renale au mutaţia genei *PKD1* (în stare heterozigotă, An), chiştii se formează numai la nivelul a 1-2% din nefroni, iar nefronii afectaţi au numai un anumit segment dilatat. O explicaţie posibilă, se bazează pe modelul „dublei lovituri" din biologia tumorală: bolnavul se naşte heterozigot (An), moştenind

o genă *PKD1* mutantă de la unul din părinți; existența unei singure gene mutante nu este însă suficientă pentru formarea chistului. În timpul vieții se produce, în anumite celule, „pierderea heterozigozității" (prin mutația somatică sau inactivarea celei de a doua gene). Celulele homozigote (AA) nu produc deloc policistină și începe formarea unei clone ce alcătuiește chistul.

Diagnosticul genotipic. Localizarea și identificarea genelor *PKD1* și *PKD2* au deschis drumul diagnosticului genotipic al ADPKD care poate tranșa diagnosticul bolii la orice vârstă (inclusiv la făt) și atunci când imagistica nu o poate face (absența unor chisti renali detectabili sau imagini incerte). Metodele de analiză moleculară permit diagnosticul ADPKD fie prin analiza directă a genei, fie prin identificarea unor markeri ADN polimorfici situați în vecinătatea genei și transmiși împreună cu aceasta („tehnici de înlănțuire genică"). Testarea genetică este indicată în două situații: stabilirea statusului genetic la tinerii peste 18 ani, cu risc de 50% (când ecografia nu poate evidenția totdeauna chiștii), care în funcție de rezultat pot lua o decizie informată în planningul lor familial; evaluarea unui donator sănătos înrudit cu pacientul care va fi transplantat.

Tratament. În prezent nu există încă un tratament care să încetinească formarea chiștilor și progresia bolii[3]. Ca urmare, metodele terapeutice folosite se adresează tratamentului în special prevenirii complicațiilor: hipertensiunea arterială, infecția chiștilor sau litiaza renală.

5. Boli ale proteinelor implicate în controlul homeostaziei extracelulare

Homeostazia (în greaca veche – *a rămâne la fel*) este definită ca fiind capacitatea organismului de autoreglare dinamică prin care își menține variabilele esențiale în limite acceptabile pentru propria sa structură și funcționare, ca răspuns la perturbările induse de mediu (Cannon, 1932). Proteinele au un rol esențial în menținerea homeostaziei organismului. Principalele procese implicate în controlul homeostaziei extracelulare sunt: apărarea imună, hemostaza și inhibiția protează.

- **Proteinele responsabile de apărarea imună** fac parte din mai multe categorii funcționale, ca, de exemplu, proteinele sistemului major de histocompatibilitate, proteinele sistemului complement, imunoglobulinele, receptorii de suprafață ai limfocitelor, diverse citokine. Toate aceste clase de proteine și funcțiile lor vor fi prezentate în capitolul 17.
- **Proteinele implicate în hemostază** pot fi clasificate în *factori de coagulare plasmatici* (factorii de coagulare I-XIII, proteina C, proteina S și TFPI – inhibitorul căii factorului tisular), *factori de coagulare plachetari*, *factori de coagulare ai suprafeței celulare* (tromboplastina tisulară și trombomodulina), *factori ai trombolizei*, la care se adaugă o serie de factori activatori și inhibitori ai componentelor amintite (activatorul tisular al plasminogenului – PLAT, sau inhibitorul activatorului plasminogenului – PAI).
- **Proteinele implicate în inhibiția proteazelor** fac parte din câteva familii importante cum sunt cele ale inhibitorilor proteazici (PI1-PI14), inhibitorii tisulari ai metaloproteinazelor (TIMP), inhibitorii proteazelor serinice (SPINK și SPINT) etc.

În cele ce urmează vom aminti doar câteva exemple de boli genetice produse prin mutații ale unor proteine implicate în controlul homeostaziei extracelulare (tabelul 12.6) și vom descrie o boală reprezentativă pentru această clasă: hemofilia A.

5.1. Hemofilia A

Hemofilia A (OMIM + 306700) este o tulburare a coagulării transmisă recesiv legat de X, determinată de o deficiență a factorului VIII plasmatic al coagulării. Factorul VIII al coagulării are rolul de cofactor al factorului IX, o protează care reglează activarea factorului X.

Incidență. Hemofilia A are o incidență de aproximativ 1 la 5.000-10.000 de nou-născuți de sex masculin.

Simptomatologie. Manifestările clinice sunt prezente de regulă la indivizi de sex masculin, deși există și cazuri foarte rare în care apar manifestări clinice la femei, care au inactivare preferențială a cromozomului X fără mutație. Boala este caracterizată prin hemoragii la traumatisme minime care pot persista pe durata câtorva ore sau zile și care conduc la formarea de hematoame la nivelul țesuturilor moi și al mușchilor, precum și a hemoragiilor intra-articulare, care evoluează spre artroză. Formele severe de boală sunt diagnosticate în perioada neonatală datorită prezenței unor hematoame cefalice excesive sau a hemoragiei prelungite la nivelul cordonului ombilical. Formele moderate dezvoltă hematoame și hemartroze odată cu începutul mersului, în timp ce în formele minore diagnosticul poate fi pus cu ocazia unor intervenții chirurgicale sau a unor traumatisme.

3. Recent au fost validate pe modele animale și introduse în testarea clinică terapii promițătoare bazate pe inhibarea proliferării celulare (Rapamicină, Roscovitină) și inhibarea secreției (antagoniști ai receptorilor V2 ai vasopresinei, somatostatinul).

Tabelul 12.6. Exemple de boli produse prin mutații ale unor proteine implicate în controlul homeostaziei extracelulare

Proteina	Gena	Localizare cromozomială	Boala	OMIM
Boli produse prin mutații ale unor proteine implicate în apărarea imună				
Factorul properdinic C	*PFC*	Xp11.4-p11.23	Deficiența de properdină legată de X	# 312060
Componenta C2 a complementului	*C2*	6p21.3	Deficiența componentei C2 a complementului	+ 217000
Proteina Wiscott-Aldrich	*WAS*	Xp11.23-p11.22	Sindromul Wiscott-Aldrich	# 301000
Tirozinkinaza Bruton	*BTK*	Xq21.3-q22	Agammaglobulinemia Bruton	* 300300
Proteinele de activare ale recombinării 1 și 2	*RAG1* *RAG2*	11p13	Sindromul Omenn	# 603554
Reglatorul traficului lizozomal	*LYST*	1q42.1-q42.2	Sindromul Chediack-Higashi	# 214500
Polipeptidul beta al citocromului B-245	*CYBB*	Xp21.1	Boala granulomatoasă cronică	# 306400
Boli produse prin mutații ale unor proteine implicate în controlul hemostazei				
Factorul V Leiden	*F5*	1q23	Deficitul factorului V	# 227400
Factorul VII al coagulării	*F7*	13q24	Deficitul factorului VII	+ 227500
Factorul VIII al coagulării	*F8C*	Xq28	Hemofilia A	+ 306700
Factorul IX al coagulării	*F9C*	Xq27.1-q27.2	Hemofilia B	# 306900
Factorul XI – tromboplastina	*F11*	4q35	Deficiența PTA	* 264900
Factorul XII al coagulării	*F12*	5q33-qter	Deficiența factorului Hageman	# 234000
Factorul von Willebrand	*VWF*	12p13.3	Boala von Willebrand	# 193400
Proteina C	*PROC*	2q13-q14	Boala trombotică congenitală determinată de deficiența proteinei C	* 176860
Boli produse prin mutații ale unor inhibitori proteazici				
Alfa-1 antitripsină	*PI*	14q32.1	Deficiența de alfa-1 antitripsină	* 107400
Inhibitorul 3 al metaloproteinazelor tisulare	*TIMP3*	22q12.1-q13.2	Distrofia maculară pseudoinflamatorie tip Sorby	# 136900
Inhibitorul proteazic tip 12	*PI12*	3q26	Encefalopatia familială cu incluzii de serpină	# 604218
Inhibitorul plasminei	*PLI*	7pter-p12	Deficitul inhibitorului plasminei	# 262850
Inhibitorul componentei C1 a complementului	*CINH*	11q11-q13.1	Angioedemul ereditar	# 106100

Diagnostic. Diagnosticul se bazează în mod curent pe măsurarea activității factorului VIII al coagulării. Diferențierea trebuie făcută în primul rând de hemofilia B, determinată de mutații ale genei pentru factorul IX al coagulării. Această boală este identică din punct de vedere clinic, dar incidența este mai redusă (1 la 100.000). În funcție de nivelul activității factorului VIII, hemofilia A poate fi clasificată în forma ușoară (activitate restantă de 5-25%), forma moderată (activitate restantă de 1-5%) și forma severă (activitate restantă sub 1%).

Genetică. Hemofilia A este determinată de mutații ale genei *F8C*, localizată la nivelul cromozomului Xq28. Mutațiile sunt extrem de variate și includ deleții, inserții, inversii și mutații punctiforme.

Cea mai frecventă mutație – care este responsabilă de aproximativ 25% dintre cazurile de boală și circa 40-50% dintre formele severe – este o inversie ce asociază și o deleție a porțiunii carboxiterminale a factorului VIII. Această inversie apare ca urmare a unui proces de recombinare intra-cromozomială neomoloagă între secvențe localizate la nivelul intronului 22 al genei și secvențe situate telomeric față de genă. O altă categorie de mutații asociate cu forme severe de boală sunt inserțiile unor elemente retrotranspozabile L1 în interiorul genei. Dintre mutațiile punctiforme, cele asociate unor forme severe sau moderate de boală sunt cele care determină apariția unor codoni stop prematuri, cele care alterează capacitatea de legare a factorului VIII la factorul von Willebrand sau la factorul IX al coagulării, ori cele care afectează capacitatea proteinei de a fi secretată.

Tratamentul standard actual constă în înlocuirea intravenoasă a factorului VIII. Acest tratament a permis prelungirea speranței de viață de la sub 2 ani la începutul secolului XX, la circa 65 de ani în prezent. Există mari speranțe pentru implementarea în viitor a unor metode de terapie genică.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 12.2

Bolile genetice ale hemoglobinei – prototip de boli moleculare

Bolile genetice ale hemoglobinei (Hb) se împart în trei mari categorii patogenice: variante structurale care sunt modificări în structura lanțurilor de globină, fără afectarea ratei lor de sinteză; talasemiile, produse prin sinteza scăzută a unuia sau mai multe lanțuri de globină; persistența ereditară a hemoglobinei fetale, determinată de o perturbare a „comutării" perinatale de la sinteza β-globinei, la γ-globină.

*(1) Cele circa 400 de **Hb anormale**, produse de obicei prin mutații punctiforme în genele globinelor, se subîmpart în trei clase:*

- *Variantele ce produc anemie hemolitică se clasifică în:*
  - *Hemoglobine anormale ce capătă noi proprietăți. **Hemoglobina S**, din sicklemie (vezi capitolul 4), rezultă prin înlocuirea Glu6Val în catenele de β-globină; acest fapt nu modifică capacitatea de fixare a oxigenului, dar scade drastic solubilitatea Hb (în sângele dezoxigenat), care se polimerizează – producând fenomenul de sicklizare; acesta generează hemoliza eritrocitelor și microtrombozele capilare. Hemoglobina C (substituția Glu6Liz), în forma sa oxigenată, tinde să cristalizeze, reducând deformabilitatea hematiilor și generând astfel o hemoliză medie.*
  - *Hemoglobine instabile (de exemplu, Hb Gun Hill) sunt determinate de mutații ce denaturează tetramerul de Hb; ele devin insolubile și precipită, formând corpii Heinz, ce contribuie la producerea hemolizei.*
- *Variante ce alterează transportul de oxigen; în acest grup se includ:*
  - *Methemoglobinele (de exemplu, Hb Hyde Park), care datorită oxidării Fe^{2+} din hem la Fe^{3+}, rezistent la methemoglobinreductază, sunt incapabile de oxigenare reversibilă;*
  - *Hb cu modificarea afinității pentru oxigen (de exemplu Hb Kempsey sau Kansas).*

*(2) **Talasemiile** sunt, în ansamblul lor, cele mai frecvente boli monogenice. Mutațiile alterează sinteza sau stabilitatea lanțurilor de α-globină sau de β-globină, producând alfa-talasemii sau beta-talasemii. Catenele ce se sintetizează normal vor fi în exces, pot precipita alterând membrana hematiilor și genera distrugerea lor. Frecvența talasemiilor este crescută în bazinul mediteranean și zonele tropicale/subtropicale din toată lumea, datorită avantajului selectiv al heterozigoților față de malarie.*

- *Alfa-talasemiile se caracterizează prin absența lanțurilor de α-globină (deleții prin CO inegal); Hb va fi formată numai din lanțuri beta (tetramerul β_4 sau HbH) sau, în perioada fetală, numai din lanțuri gama (teramerul γ_4 sau Hb Bart); ambele sunt transportori ineficace de oxigen, generând hipoxie. Gravitatea bolii depinde de numărul de lanțuri α deletate: αα/α– , purtător sănătos; α–/α–, trăsătura α–talasemică (anemie ușoară); HbH(β_4), α–/– –, anemie hemolitică severă; Hb Bart (γ_4), – –/– –, ce produce hidrops fetalis letal.*
- *Beta-talasemiile se caracterizează prin scăderea producției lanțurilor de β-globină; excesul de lanțuri de β-globină precipită generând anemie hemolitică. În locul lanțurilor β se sintetizează lanțuri δ și astfel crește cantitatea de HbA2 sau lanțuri γ și atunci crește sinteza HbF. Indivizii homozigoți, cu două gene β mutante, prezintă o formă severă de anemie și boala se numește talasemia major (cu diferite forme, funcție de cantitatea de HbA ce se poate forma: β^0-talasemia, când absența de sinteză a lanțurilor β este aproape completă și nu se formează HbA; β^+-talasemia cu HbA detectabilă). Indivizii heterozigoți, cu o singură alelă β mutantă, au o ușoară anemie microcitară hipocromă (talasemia minor sau trăsătura beta-talasemică); detecția lor – prin creșterea cantității de HbA2 – este utilă pentru sfatul genetic.*

*(3) **Persistența ereditară a Hb fetale** este reprezentată de un grup de afecțiuni, relativ benigne, caracterizate prin imposibilitatea comutării postnatale a sintezei lanțurilor γ de Hb la sinteza lanțurilor β; în consecință pacienții au un exces de HbF ($\alpha_2\delta_2$) și o scădere a producției de HbA ($\alpha_2\beta_2$).*

Sfat genetic. Dacă o femeie are istoric familial de hemofilie, statusul său purtător poate fi determinat prin analize de înlănțuire sau prin *screening*-ul mutației genei *F8C* atunci când aceasta a fost identificată deja la o rudă. Există și teste care pot fi utilizate pentru analiza prezenței celei mai frecvente mutații, inversia mai sus amintită. Determinarea statusului de purtător prin metode enzimatice este dificilă. Dacă femeia este purtătoare, ea are un risc de 50% de a da naștere unor băieți bolnavi și un risc egal de a da naștere unor fete purtătoare. Având în vedere frecvența inactivării preferențiale a cromozomului X există și un risc mic de a se naște o fată cu simptome de hemofilie. În cazurile în care mama are un băiat cu hemofilie, dar nu există istoric familial pozitiv, trebuie luată în calcul posibilitatea unor mutații *de novo*, care sunt responsabile pentru circa 1/3 dintre cazurile de boală. În acest caz, riscul de recurență a bolii este în general mai mic (posibilitatea unui mozaicism germinal).

C. Boli genetice produse prin expansiunea repetițiilor nucleotidice (mutații dinamice)

În 1991, au apărut primele rapoarte privind implicarea **expansiunii unor repetiții trinucleotidice** în etiologia a două boli genetice: repetiția CGG în cazul sindromului X fragil și repetiția CAG în cazul atrofiei musculare spinobulbare (boala Kennedy). În ambele cazuri s-a constatat că, pe măsură ce gena trece de la o generație la alta, numărul de repetiții trinucleotidice crește progresiv, suferă o *expansiune* (de aici și numele de mutații dinamice sau instabile) și, când depășește un *anumit prag critic*, produce anomalii în expresia genei sau funcția proteinei codificate de genă, care determină starea de boală. De asemenea, s-a constatat că există o strânsă corelație între creșterea numărului acestor repetiții și apariția mai precoce și severitatea mai mare a manifestărilor clinice. Ulterior, s-a dovedit că acest mecanism al mutațiilor dinamice este caracteristic și altor boli genetice, astfel că, în prezent, se poate vorbi clar despre o nouă clasă de boli genetice: bolile produse prin **mutații dinamice**, instabile sau prin expansiunea unor repetiții simple, cel mai frecvent trinucleotidice. Recent au fost descrise afecțiuni prin expansiunea unor repetiții mai mari – de exemplu tetranucleotidul CCTG în distrofia miotonică 2 sau pentanucleotidul ATTCT în atrofia spinocerebeloasă 10.

În prezent se cunosc 22 de afecțiuni neurologice sau neuromusculare (tabelul 12.7) determinate de expansiunea repetițiilor nucleotidice, marea lor majoritate (19) fiind rezultatul **expansiunii unor repetiții nucleotidice**.

1. Caractere generale. Clasificare

Bolile produse prin expansiunea repetițiilor nucleotidice, majoritatea lor fiind repetiții trinucleotidice (RTN) sunt *heterogene* prin: localizarea diferită a RTN în structura genei afectate (regiuni codante sau necodante: promotor, în regiunile netranslate 5' sau 3' UTR sau introni; vezi tabelul 7.2); gradul diferit al expansiunilor, mai mici sau mai mari; mecanisme patogenice diferite: pierderea funcției genei sau câștig de funcție. Totuși, mutațiile dinamice prezintă o serie de proprietăți comune:

- o creștere moderată a numărului repetițiilor nu se asociază de obicei cu apariția manifestărilor clinice, dar determină o creștere a instabilității repetiției (**premutații**);
- **mutațiile complete** ce produc boala sunt rezultatul unei modificări a numărului repetițiilor față de numărul inițial (de regulă, o creștere peste un anumit prag);
- există o relație relativ liniară între numărul de copii a repetiției și severitatea clinică ori vârsta de apariție a simptomelor (fenomenul de **anticipație**: datorită expansiunii succesive a RTN în succesiunea generațiilor vârsta de debut este mai mică și/sau severitatea bolii mai mare);
- formele cele mai severe se transmit de preferință de către unul dintre părinți (*efect parental*), ca de exemplu transmiterea paternală în cazul bolilor poliglutaminice. Mecanismul acestui „**efect parental**" nu este încă precis cunoscut; foarte probabil aceasta reflectă o supraviețuire diferită a gameților ce poartă o expansiune mare și nu o tendință de expansiune mai mare la un sex decât la altul;
- mecanismul principal de producere a mutațiilor dinamice este „*glisarea*" sau „*deraparea*" *replicativă*, determinată de alinierea greșită și împerecherea decalată a repetițiilor trinucleotidice (vezi figura 7.8);
- analiza ADN-ului este cel mai bun mijloc de diagnostic precis al fiecăreia dintre bolile prin expansiune a unor repetiții simple.

Mutațiile dinamice se pot asocia cu pierderea funcției sau câștig de funcție. Creșterea numărului repetițiilor poate induce alterarea transcripției și, consecutiv, *pierderea funcției* prin mecanisme diverse.

> Exemple sunt: *sindromul X fragil*, în care expansiunea repetiției CGG în regiunea promotor a genei *FMR1* conduce la hipermetilarea acestuia și represie; *epilepsia mioclonică*, în care expansiunea repetiției determină separarea fizică a factorilor de transcripție în regiunea promotor a genei pentru cistatina B; *ataxia Friedreich*, în care expansiunea repetiției intronice conduce la apariția unor conformații terțiare ale ADN care interferă transcripția genei pentru frataxină. Toate aceste cazuri vor prezenta transmitere recesivă, autozomală sau legată de X. Există însă și cazuri în care reducerea activității sau a nivelului unui produs genic realizează un mod de transmitere dominantă, ca urmare a fenomenului de haploinsuficiență. Acesta pare a fi cazul expansiunii repetiției CTG în regiunea promotor a genei *SIX5* în cazul *distrofiei miotonice*.

Mutații dinamice cu *câștig de funcție*. Numeroase expansiuni trinucleotidice sunt localizate în interiorul regiunilor codante ale unor gene și, ca urmare, vor fi translate în structura proteinei (de exemplu sub forma unor *tracturi poliglutaminice* în cazul repetiției CAG).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 12.7. Boli produse prin expansiunea instabilă a repetițiilor nucleotidice
(adaptat după McMurray, 2010; La Spada și Taylor, 2010; Strachan și Read, 2010)

Boala**	Secvența repetată*	Gena	Localizarea repetiției	Efectul parental	Număr de repetiții		
					normal	pre-mutație	mutație completă
Boli cu repetiții nucleotidice în regiuni codante							
Boli cu expansiuni de glutamină							
Boala Huntington (HD) (OMIM # 143100)	CAG	*HTT*	Exon 1	P	6-28	29-37	38-180
Atrofia musculară spinală și bulbară (SMAX1) sau boala Kennedy (OMIM # 313200)	CAG	*AR*	Exon 1	P	13-31	32-39	>40
Atrofia dentatorubral-palidoluysiană (DRPLA) (OMIM # 125370)	CAG	*ATN1*	Exon 1	P	6-34	35-48	49-88
Ataxia spinocerebeloasă tip 1 (SCA1) (OMIM # 164400)	CAG	*ATXN1*	Exon 8	P	6-39	40	41-83
Ataxia spinocerebeloasă tip 2 (SCA2) (OMIM # 183090)	CAG	*ATXN2*	Exon 1	P	<31	31-32	32-200
Ataxia spinocerebeloasă tip 3 (SCA3) sau boala Machado-Joseph (OMIM # 109150)	CAG	*ATXN3*	Exon 8	P	12-40	41-85	52-86
Ataxia spinocerebeloasă tip 6 (SCA6) (OMIM # 183086)	CAG	*CACNA1*	Exon 47	P	<18	19	20-33
Ataxia spinocerebeloasă tip 7 (SCA7) (OMIM # 164500)	CAG	*ATXN7*	Exon 3	P	4-17	28-33	36-460
Ataxia spinocerebeloasă tip 17 (SCA17) (OMIM # 607136)	CAG	*TBP*	Exon 3	P > M	13-31	32-39	>40
Boli cu expansiuni de alanină							
Distrofia musculară oculo-faringinană (OPMD) (OMIM # 164300)	GCN[4]	*PABPN1*	Exon 1	P și M	10[5]	–[6]	11-17[7]
Retardul mental non-sindromic legat de X/ Sindromul West/Sindromul Partington (OMIM # 309510)	GCN[7]	*ARX*	Exon 2	?	16[8] 12	–[9]	17-23[11] 20
Sindromul mână-picior-genital (OMIM # 140000)	GCN[7]	*HOXA13*	Exon 1	?	14[9]	–[9]	24, 28
Sinpolidactilia dominantă (SPD1) (OMIM # 186000)	GCN[7]	*HOXD13*	Exon 1	?	15	–[9]	21-29[10]
Displazia cleido-craniană (OMIM # 119600)	GCN[7]	*RUNX2*	Exon 2	?	17	–[9]	27
Sindromul congenital de hipoventilație centrală (CCHS) (OMIM # 209880)	GCN[7]	*PHOX2B*	Exon 3	?	20	–[9]	25-33

4. Repetiția supusă expansiunii este notată GCN deoarece acidul aminat alanină este codificat de patru codoni (GCA, GCT, GCC și GCG), iar repetițiile sunt imperfecte.
5. Alanina este codificată de patru codoni: GCA, GCT, GCC și GCG. Alela normală – notată $(CGN)_{10}$ – conține zece codoni ce codifică acest acid aminat, din care șase sunt GCG.
6. Nu au fost descrise alele premutate în această boală.
7. Alela $(CGN)_{11}$ este recesivă (a fost identificată la un bolnav homozigot pentru această mutație). Alelele $(GCN)_{12-17}$ sunt dominante.
8. Gena *ARX* conține patru repetiții ce codifică alanina: trei în cel de-al doilea exon (cu 16, 12 și, respectiv, 7 repetiții) și unul în exonul patru (cu 9 repetiții). Expansiunile sunt localizate în exonul 2, în prima și a doua repetiție.
9. Exonul 1 al genei *HOXA13* conține trei repetiții de polialanină (14, 12 și 18 acizi aminați). Amplificările au fost identificate numai în prima repetiție.
10. Corelațiile genotip-fenotip au arătat o penetrantă redusă și o expresivitate variabilă la purtătorii alelelor cu expansiuni scurte și o penetranță crescută asociată cu un fenotip mai grav la purtătorii de alele cu expansiune importantă (>25 repetiții).
11. Exonul 1 al genei *SOX3* conține două regiuni ce codifică 15 și 10 polialanine. Expansiuni au fost identificate numai în primul tract de polialanine.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Boala**	Secvența repetată*	Gena	Localizarea repetiției	Efectul parental	Număr de repetiții		
					normal	pre-mutație	mutație completă
Retard mental legat de X și panhipopituitarism (OMIM # 300123)	GCN[7]	*SOX3*	Exon 1	?	15[11]	–[9]	22-26
Sindromul blefarofimoză-ptoză-epicantus inversat (OMIM # 110100)	GCN[7]	*FOXL2*	Exon 1	?	14	–[9]	19-24
Holoprozencefalia 5 (OMIM # 609637)	GCN[7]	*ZIC2*	Exon 3	?	15	–[9]	25
Boli cu repetiții nucleotidice în regiuni necodante							
Sindromul X fragil – situs A (FRAXA) (Xq27.3) (OMIM # 300624)	CGG	*FMR1*	5' UTR	M	6-50	55-200[12]	200-4.000
Sindromul X fragil – situs E (FRAXE) (Xq28) (OMIM # 309548)	GCC	*FMR2*	5' UTR	M	4-39	40-200	>200
Distrofia miotonică 1 (DM1) (OMIM # 160900)	CTG	*DMP*	3' UTR	M	5-37	37-50	>50
Distrofia miotonică 2 (DM2) (OMIM # 602668)	CCTG	*ZNF9*	Intron 1	?	< 30	31-74	75-11.000
Ataxia Friedreich (FRDA) (OMIM # 229300)	GAA	*FXN*	Intron 1	?	5-30	31-100	>100
Boala Huntington-like tip 2 (HDL2) (OMIM # 606438)	CTG	*JPH3*	3' UTR	M	6-27	29-35	36-57
Ataxia spinocerebeloasă tip 8 (SCA 8) (OMIM # 608768)	CTG	*ARTXN8*	3' UTR	M	15-34	34-89	89-250
Ataxia spinocerebeloasă tip 12 (SCA12) (OMIM # 604326)	CAG	*PPP2R*	5' UTR	M și P	7-28	28-66	66-78
Ataxia spinocerebeloasă tip 10 (SCA10) (OMIM # 603516)	ATTCT	*ATXN10*	Intron 9	M și P	10-29	29-400	>400
Epilepsia mioclonică progresivă Unverricht-Lundborg (EPM1) (OMIM # 254800)	CCCCG CCCCG CG	*CSTB*	Promotor	?	2-3	4-40	40-80
Sindromul Usher tip 1C (USH1C) (OMIM # 276904)	VNTR de 45 pb	*USH1C*	Intron 5	?	? 6	–	9[13]

* S-a stabilit prin convenție (1993) că nomenclatura tripletelor repetitive să se facă în direcția 5'›3'.
** În paranteză este prezentată prescurtarea uzuală a bolii după denumirea în limba engleză.

Multe dintre bolile produse prin mutații dinamice asociază asemenea tracturi poliglutaminice expansionate, ceea ce a condus la ipoteza că acestea ar putea exercita un efect „toxic" asupra funcției proteinelor. Un asemenea efect ar putea fi de exemplu o modificare a structurii tridimensionale a proteinei care conține tractul poliglutaminic. Există însă și alte mecanisme care conduc la un câștig de funcție. În bolile prin expansiunea CTG (distrofiile miotonice 1 și 2), câștigul de funcție este determinat de producerea unui ARN toxic, iar expansiunea CAG la nivelul genei *CACNA1A* (ce codifică un canal de calciu) în ataxia spinocerebeloasă tip 6 conduce la o creștere a capacității de transport a calciului de către proteina codificată.

12. Alelele premutate ale genei *FMR1* se manifestă fenotipic și determină la ambele sexe sindromul neurologic X fragil - tremor - ataxie (FXTAS) și, la femei, menopauză precoce.
13. Alelă recesivă identificată fie la bolnavi homozigoți, fie heterozigoți compoziți.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din punct de vedere patogenic se deosebesc două mari categorii (stabilite pe bazele unor caracteristici similare): boli prin expansiunea RTN în regiunile codante şi boli prin expansiunea RTN în regiunile necodante (tabelul 12.7).

Bolile prin expansiunea repetiţiei trinucleotidice în regiunile codante pot fi grupate în boli cu expansiunea repetiţiei CAG ce codifică glutamina (Q) sau boli poli-Q şi boli cu expansiunea repetiţiei GCN[14] ce codifică alanina (A) sau boli poli-A.

Bolile poli-Q sunt afecţiuni neurodegenerative, cele mai frecvente fiind boala Huntington şi diferite forme de ataxii spino-cerebeloase. Caracteristicile comune ale aceste afecţiuni sunt:

- instabilitatea repetiţiilor apare la un prag de circa 29-35 de unităţi;
- mărimea expansiunii este modestă (expansiuni scurte), de ≤10 repetiţii/generaţie;
- în cursul sintezei de proteine, expansiunea repetiţiei CAG este translată într-o serie continuă de reziduuri de *glutamină (Q)*, formând *un tract poliglutaminic (poli Q)* în proteina codificată de gena cu expansiunea (CAG)n. Prezenţa acestui tract predispune la formarea unor agregate proteice intracitoplasmatice care sunt toxice pentru celule, în special neuroni, şi duce la apariţia unei boli neurodegenerative progresive.

Bolile poli-A sunt foarte variate ca manifestări clinice, de la boli neurodegenerative la sindrome polimalformative. Caracteristicile comune ale aceste afecţiuni sunt:

- alelele normale au între 10 şi 16 alanine şi nu au fost descrise alele premutante, trecerea de la alela normală la alela mutantă făcânduse în decursul unei singure generaţii;
- mărimea expansiunii este modestă (expansiuni scurte), de ≤10 repetiţii/generaţie;
- în cursul sintezei de proteine, expansiunea repetiţiile GCN este translată într-o serie continuă de reziduuri de *alanină (A)*, formând *un tract poli-alanină (poli A)* în proteina codificată de gena cu expansiunea (GCN)n. Prezenţa acestui tract determină pierderea funcţiei proteinei, fie prin formarea unor agregate proteice intracitoplasmatice ca în cazul expansiunilor poli-Q, fie prin perturbarea localizării nucleare a acestor proteine ce, în majoritate, sunt factori de transcripţie.

Bolile prin expansiunea unor repetiţii trinucleotidice în regiunile necodante (numite şi **boli non-poli Q**) sunt reprezentate, în special, de sindromul X fragil, distrofiile miotonice 1 şi 2 şi boala Friederich. De remarcat prezenţa unor repetiţii particulare în unele boli: repetiţii tetra- şi pentanucleotidice sau amplificarea unui VNTR de 45 perechi de baze (tabelul 12.7). Aceste boli se caracterizează prin:

- repetiţiile devin instabile la circa 55-200 unităţi;
- numărul de repetiţii câştigate la fiecare generaţie este cu mult mai mare decât în expansiunile localizate în regiunile codante (expansiuni lungi)[15], de 100-10.000/generaţie;
- mecanisme patologice diferite, fie pierderea funcţiei prin represia genei determinată de hipermetilarea promotorului (în sindromul X fragil), fie câştigul de funcţie prin producerea unui ARNm toxic (în distrofiile miotonice 1 şi 2).

În această secţiune vom discuta consecinţele patogenice pe care aceste mutaţii le au asupra genei afectate şi vom prezenta două exemple ilustrative de boli frecvente, produse prin acest mecanism: boala Huntington şi distrofia miotonică; despre sindromul X fragil vom discuta în capitolul 16.

2. Boala Huntington

Boala (sau coreea) Huntington (OMIM # 143100) este o boală neurologică degenerativă, progresivă, caracterizată printr-un sindrom extrapiramidal, însoţit de tulburări psihice care evoluează spre demenţă. Boala se transmite autozomal dominant şi este determinată de mutaţii dinamice ale genei *HTT* pentru *huntingtină*.

Prevalenţa bolii în populaţia europeană este de circa 1 la 20.000 de persoane.

Simptomatologie. Boala este caracterizată prin apariţia în a doua jumătate a vieţii a unor tulburări neurologice motorii (coree, distonie), tulburări cognitive şi de personalitate care evoluează progresiv. În stadiile avansate de boală, pacienţii dezvoltă tulburări motorii severe (care îi fac dependenţi), pierdere ponderală, tulburări de somn, incontinenţă şi mutism, iar evoluţia este inexorabilă către decesul prematur (vârsta medie la deces fiind 55 de ani).

Genetică. Boala Huntington se transmite autozomal dominant, dar are o penetranţă dependentă de vârstă (vezi figura 6.24). Boala este determinată de

14. În tripletul CGN – N semnifică diferite nucleotide deoarece alanina este codificată de patru codoni.
15. Se pune firesc întrebarea: de ce unele repetiţii au o expansiune mai mare decât altele? Intervine un mecanism diferit? Recent s-a demonstrat că expansiunile mari, lungi, se produc în stadiile de „repaus replicativ", fie în faza de dictioten a ovocitelor, fie în celulele somatice cu diferenţiere terminală (neuroni), printr-un mecanism de reparare a rupturilor bicatenare şi nu prin glisare replicativă.

BCU ASE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mutații ale genei *HTT* pentru huntingtină care afectează predominant striatumul și cortexul și determină manifestările clinice caracteristice. Mutațiile care cauzează boala Huntington sunt de regulă expansiuni ale unei repetiții CAG, localizată la nivelul exonului 1 al genei *HTT*.

- Alelele normale ale genei au 10-26 de repetiții.
- Alelele cu un număr de 27-35 de repetiții *nu* determină manifestări clinice, dar se asociază cu un risc crescut de expansiune până la mutații complete în cursul gametogenezei.
- Alelele mutante ce produc boala au peste 35 de repetiții; penetranța unor alele cu 36-41 repetiții este însă redusă.
- Vârsta pacientului în momentul diagnosticului este invers corelată cu numărul repetițiilor CAG; astfel, formele cu debut la adult se asociază cu un număr de 40-55 de repetiții, în timp ce debutul juvenil al bolii este asociat unui număr de peste 60 de repetiții CAG; nu există însă corelații între numărul repetițiilor CAG și alte trăsături ale bolii.
- Transmiterea mutațiilor în succesiunea generațiilor se asociază cu un risc de amplificare a numărului repetițiilor, ceea ce determină fenomenul de *anticipație* (apariția mai precoce a bolii în succesiunea generațiilor). Acest fenomen de amplificare este mult mai frecvent în gametogeneza masculină. Ca urmare, indivizii care moștenesc o alelă mutantă de la tată au un risc mai mare de a dezvolta forme de boală cu debut juvenil (circa 80% dintre cazurile severe având alela mutantă moștenită de la tată).

Patogenie. Amplificarea secvenței repetiției CAG conduce la expansiunea tractului poliglutaminic din structura huntingtinei, ceea ce este echivalentul unei mutații cu câștig de funcție. Huntingtina mutantă pare să fie cauza acumulării unor agregate în citoplasma și nucleii neuronilor de la nivelul neostriatului, cu modificări consecutive ale nivelului receptorilor exprimați la acest nivel care, în final, conduc la moartea neuronală. Studii recente arată că moartea neuronilor din corpul striat se datorează unei proteine numită RHES care se găsește exclusiv la acest nivel. RHES induce sumoilarea huntingtinei mutantă, inducând degradarea acesteia și, ca urmare, moartea celulei nervoase.

Tratament. În prezent, nu există nici un tratament curativ al bolii. Cu toate acestea există tratamente recente care permit atenuarea simptomatologiei bolii. Tetrabenazina, medicament aprobat în 2008, reduce severitatea coreei. La acestea se adaugă numeroase alte medicamente aflate în diferite stadii de studiu în trialuri clinice.

Sfat genetic și diagnostic presimptomatic. Întrucât debutul bolii la vârsta adultă are loc frecvent către sfârșitul perioadei reproductive, este probabil ca persoanele purtătoare să fi transmis deja mutația la descendenți. Probabilitatea unui individ de a fi purtător de genă mutantă (heterozigot), dacă este clinic neafectat, dar are un părinte afectat, se calculează conform teoremei Bayes (vezi capitolul 10). Riscul de transmitere a unor mutații complete este de 50%. În cazul purtătorilor unor premutații, riscul de expansiune către o mutație completă este de circa 3% în cazul meiozei masculine. În prezent, sunt disponibile metode de diagnostic prenatal și presimptomatic bazate pe analiza numărului repetițiilor CAG de la nivelul exonului 1 al genei *HTT*. Diagnosticul presimptomatic pune însă numeroase probleme etice având în vedere trauma psihologică pe care o asociază predicția unei boli pentru care nu există un tratament curativ.

3. Distrofia miotonică

Distrofia miotonică este o afecțiune neuromusculară transmisă autozomal dominant cu o incidență de circa 1 la 8.000 de nou-născuți, caracterizată prin penetranță incompletă și expresivitate variabilă. Cele mai cunoscute forme de distrofie miotonică prezente la adult sunt:

- Distrofia miotonica de tip I sau maladia Steinert (98% dintre cazuri) care poate prezenta mai multe forme clinice: congenitală, cu debut în copilărie, cu debut la adult sau forme benigne.
- Distrofia miotonică de tip II care afectează cu predilecție musculatura proximală.

Manifestări clinice. Simptomele apar de regulă la adultul tânăr, primul semn fiind cel mai adesea întârzierea capacității de relaxare a mâinii după încleștarea pumnului. Acest semn este denumit *miotonie* și este prezent în majoritatea cazurilor simptomatice, fiind urmat de hipotonie și hipotrofie musculară progresive. Alte manifestări frecvente sunt tulburările de conducere cardiacă, afectarea musculaturii netede, tulburările mentale, hipersomnia, cataracta și diabetul insulino-dependent. La bărbați se adaugă atrofia testiculară și calvița frontală precoce. Există și forme congenitale care se caracterizează prin severitate crescută (hipotonie musculară severă, retard mental major, diplegie facială, dificultăți de nutriție și tulburări respiratorii) și mortalitate neonatală de până la 25%.

Genetică. Studii de înlănțuire au permis cartografierea genei responsabile de boală pe cromozomul 19q13.2-q13.3, iar în 1992 a fost identificată gena *DMPK* (ce codifică o protein-kinază) și mutația ce produce boala în distrofia miotonica Steinert. Maladia Steinert este inclusă în prezent în categoria bolilor determinate de mutații dinamice, afecțiunea fiind

asociată cu expansiunea unui triplet CTG în regiunea 3' netranslată a genei. Numărul normal al acestor repetiţii variază între 5 şi 30; formele moderate de boală asociază 50-80 de copii ale tripletului, în timp ce indivizii cu forme severe de boală au peste 2.000 de copii. Amplificarea repetiţiei poate avea loc atât în meioza masculină, cât şi în cea feminină. Cu toate acestea, expansiunile masive, de ordinul a mii de repetiţii, apar numai în gametogeneza feminină. Ca urmare, formele congenitale de boală sunt aproape întotdeauna transmise pe cale maternă. Este posibil ca în patogenia bolii să fie implicată şi alterarea funcţiei unor gene vecine *DMPK*, cum sunt genele *SIX5* (care codifică un factor de transcripţie), *DMAHP* şi *RSHL1*. Distrofia miotonică de tip 2 este determinată de expansiunea secvenţei tetranucleotidice (CCTG) prezentă la nivelul genei *ZNF9* situată pe cromozomul 3q21. Numărul de repetiţii CCTG este cuprins între 75 şi 11.000 de copii, dar nu există o corelaţie între lungimea repetiţiei şi severitatea bolii.

Tratament. În prezent un există nici un tratament specific al bolii. Singurele terapii folosite sunt cele ţintite ameliorării simptomelor. Cu toate acestea, înţelegerea patogeniei bolii a deschis calea către pobabilitatea dezvoltării unor metode specifice de tratament în viitorul apropiat.

CASETA 12.3

Ataxiile spinocerebeloase

Ataxiile spincerebeloase (SCA) sunt un grup de afecţiuni neurodegenerative, heterogen din punct de vedere clinic şi genetic, cu evoluţie lentă şi progresivă spre sfârşit letal (deoarece nu au tratament). SCA se manifestă printr-un sindrom cerebelos exprimat prin tulburări de mers şi echilibru, coordonare redusă a mişcărilor mâinilor, dizartrie şi/sau tulburări oculomotorii, determinat de o degenerescenţă a cerebelului, asociată în anumite tipuri de afectarea retinei, nervului optic, sistemului ponto-medular, măduva spinării sau nervii periferici. Debutul manifestărilor clinice este de obicei la vârsta de 30-50 de ani. Diagnosticul se bazează pe istoricul familial, examenul clinic şi neuroimagistic, dar mai ales pe testarea moleculară. Tratamentul actual este exclusiv simptomatic.

Prevalenţa globală a SCA este de 0,8-3,5 la 100.000, cu variaţii regionale datorită efectului de fondator. Au fost descrise până în prezent 29 de tipuri, determinate de mutaţii în gene diferite. Majoritatea formelor se transmit autozomal dominant, dar sunt şi forme recesive sau legate de X. Cele mai multe SCA sunt produse prin expansiunea tripletului CAG, ce determină adăugarea de repetiţii de glutamină în proteinele asociate bolii (ataxine şi altele); fac parte din bolile poliQ sau poliglutaminice. Variabilitatea expansiunii trinucleotidice explică variabilitatea vârstei de debut şi fenomenul de anticipaţie.

Bibliografie specifică selectivă

1. An X, Mohandas N. *Disorders of red cell membrane*. Br J Haematol 2008;141:367-375.
2. Basel D, Steiner RD. *Osteogenesisi imperfecta: recent findings shed new light on this once well-understood conditions*. Genet Med 2009; 11:375-385.
3. Borst P, Elferink RO. *Mammalian ABC transporters in health and disease*. Ann Rev Biochem 2002; 71:537-592.
4. Bowen DJ. *Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights*. J Clin Pathol 2002; 55:1-18.
5. Berry GT, Segal S, Gitzelmann R. *Disorders of Galactose Metabolism*. În Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH (ed.). *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. ed. a IV-a. Springer, New York, 2006.
6. Bushby K *et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management*. Lancet Neurol 2010; 9:77-93.
7. Bushby K *et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management*. Lancet Neurol 2010; 9:177-189.
8. Callewaert B, Malfait F, Loeys B, De Paepe A. *Ehlers-Danlos syndromes and Marfan syndrome*. Best Pract Res Clin Rheumatol 2008; 22:165-189.
9. Cao A, Galanello R. *Beta-thalassemia*. Genet Med 2010; 12:61-76.
10. Cederbaum S. *Phenylketonuria: an update*. Curr Opin Pediat 2002; 14:702-706.
11. Chapin HC, Caplan MJ. *The cell biology of polycystic kidney disease*. J Cell Biol 2010; 191:701-710.
12. Delaunay J. *Molecular basis of red cell membrane disorders*. Acta Haematol 2002; 108:210-218.
13. Dion V, Wilson JH. *Instability and chromatin structure of expanded trinucleotide repeats*. Trends Genet 2009; 25:288-297.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

14. Ditch S, Sammarco MC, Banerjee A, Grabczyk E. *Progressive GAA•TTC repeat expansion in human cell lines.* PLoS Genet 2009; 5:e1000704.
15. Hubner CA, Jentsch TJ. *Ion channel diseases.* Hum Mol Genet 2002; 11:2435-2445.
16. La Spada AR, Taylor JP. *Repeat expansion diseases: progress and puzzle in disease pathogenesis.* Nat Rev Genet 2010; 11:247-258.
17. Lewis R. *Human Genetics – Concepts & Applications.* ed. a IX-a. McGraw Hill, 2009, 202-239.
18. Nishino I, Ozawa E. *Muscular dystrophies.* Curr Opin Neurol 2002; 15:539-544.
19. Olkkonen VM, Ikonen E. *Genetics defects of intracellular-membrane transport.* N Engl J Med 2000; 343:1095-1104.
20. Richards RI. *Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease.* Hum Mol Genet 2001; 10:2187-2194.
21. Ratjen F, Doring G. *Cystic fibrosis.* Lancet 2003; 361:681-689.
22. Ross CA, Tabrizi SJ. *Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment.* Lancet Neurol 2011; 10:83-98.
23. Shao J, Diamond MI. *Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy.* Hum Mol Genet 2007; 16:R115-123.
24. Shapiro JR, Sponsellor PD. *Osteogenesis imperfecta: questions and answers.* Curr Opin Pediatr 2009; 21:709-716.
25. Wu G, Somlo S. *Molecular genetics and mechanism of autosomal dominant polycystic kidney disease.* Mol Genet Metab 2000; 69:1-15.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 13

BOLILE MITOCONDRIALE

Trăsătura unificatoare a celor peste 120 de fenotipuri patologice atribuite alterării genetice a funcției mitocondriilor o constituie *deficitul balanței energetice*. Scăderea, sub un prag critic, a producției de energie la nivel mitocondrial antrenează perturbări majore ale activităților celulare, traduse prin declinul capacității unor țesuturi și organe de a-și îndeplini funcțiile specifice.

În marea lor majoritate, defectele genetice ale mitocondriilor se manifestă prin *deteriorarea funcțiilor sistemului nervos și ale celui muscular*, a căror activitate este dependentă prevalent de energia rezultată din procesul *fosforilării oxidative* (OXPHOS). Patologia mitocondrială nu reprezintă însă apanajul exclusiv al neurologiei. Virtual, *toate organele* pot ajunge în starea de incapacitate funcțională provocată de defecte ale mitocondriilor și, ca atare, multe dintre specialitățile medicale sunt inerent confruntate cu acest tip de patologie, identificat în urmă cu doar cinci decenii, și care se singularizează printr-o serie de caracteristici neobișnuite. Cunoașterea acestor afecțiuni se impune ca o condiție obligatorie a optimizării diagnosticului și a evaluării corecte a prognosticului variatelor entități morbide în a căror patogenie sunt implicate alterările mutaționale ale genomului mitocondrial; este demn de subliniat că incidența lor depășește cifra de 1:3.500 de nou-născuți[1] (valoare comparabilă cu cea a fibrozei chistice în populația caucaziana din SUA) și acest fapt implică, o dată în plus, *necesitatea recunoașterii și diagnosticării corecte a patologiei mitocondriale*.

A. Structura moleculară, biogeneza și funcțiile mitocondriale

1. Genomul mitocondrial

Celulele umane conțin între 500 și 2.000 de mitocondrii, fiecare dintre aceste organite având în alcătuirea ei 2-10 molecule circulare de ADN dublu catenar (vezi figura 3.20), formate din câte 16.569 pb. Excepții sunt eritrocitele, care nu au mitocondrii, ovulele nefertilizate și trombocitele – în ale căror mitocondrii se află doar o singură moleculă de ADN.

1.1. Particularitățile ADN mitocondrial

Trăsăturile care diferențiază ADN mitocondrial (ADNmt) de ADN nuclear (ADNn) au fost prezentate în capitolul 3.C.4 și sintetizate în tabelul 3.4. Considerăm însă utilă o succintă recapitulare a particularităților ADNmt.

- Cele două catene de ADNmt se *deosebesc* prin conținutul lor în baze azotate și, implicit, prin densitatea de plutire: una dintre catene este bogată în *guanină* (lanțul greu, **H**); în mod corespunzător, catena complementară are un conținut mare de *citozină* (lanțul ușor, **L**).
- ADNmt este *lipsit de introni*: exceptând un segment de aproximativ 1.000 pb, (bucla D – *displacement-loop*) în care se află atât originea replicării lanțului greu, cât și promotorii transcrierii ambelor catene; întreaga secvență a ADNmt este copiată în molecule funcționale de ARN.
- Genele din ADNmt sunt *contigue* sau separate prin doar 1-2 pb.
- Patru dintre cele 64 de „cuvinte" ale codului genetic al ADNmt au o *altă semnificație* decât cea a codonilor din genomul nuclear (codoni „eretici" sau „disidenți": UGA, care în citosol este transcris în codon stop, în matricea mitocondrială codifică triptofan; AGG și AGA codifică un codon stop în

1. Recent (Poulton et al, 2010) estimează că 1:400 persoane, de toate vîrstele, au mutații mitocondriale patogene.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

locul argininei, iar AUA codifică metionina în loc de izoleucină.

- Atât în procesul replicării, cât şi în cel al transcrierii, ADNmt se comportă ca *o unitate*: o dată iniţiate, cele două procese se desfăşoară fără întrerupere, parcurgând întreaga lungime a moleculei.
- ADN polimeraza γ, enzima replicării ADNmt, operează cu o *fidelitate inferioară* celei a ADN-polimerazelor δ şi ε, acceptând împerecheri greşite sau alunecând peste unul sau mai multe nucleotide.
- Mitocondriile *nu posedă sisteme eficiente de reparare*[2] a ADN-ului şi, ca atare, erorile inerente replicării, precum şi leziunile produse accidental rămân, în marea lor majoritate, necorectate şi *se acumulează în genom sub formă de mutaţii*; în plus, rata evenimentelor recombinaţionale este foarte redusă.
- ADNmt *nu formează complexe cu histonele* (care au rol protector) şi de aceea este deosebit de *vulnerabil la acţiunea agenţilor mutageni*, dintre care unii – radicalii liberi de oxigen puternic agresivi – sunt generaţi în cantităţi mari chiar în matricea mitocondrială, adică în mediul în care se află moleculele de ADNmt.

Ultimele trei caracteristici sunt cele care furnizează explicaţia faptului că *în ADNmt mutaţiile se produc cu o frecvenţă de 10-20 de ori mai mare decât în ADN-ul nuclear.*

1.2. *Homoplasmia, heteroplasmia şi segregarea replicativă*

Ca urmare a ratei înalte a mutaţiilor produse în ADNmt, celulele somatice ale unui adult conţin, de regulă, *mixturi de mitocondrii* – unele cu genom normal şi altele cu genom modificat prin mutaţii. Termenul utilizat pentru a desemna coexistenţa într-o celulă a mitocondriilor genetic normale şi a celor mutante este cel de **heteroplasmie**[3], iar cel care defineşte prezenţa *exclusivă* a unui tip – normal sau anormal – de mitocondrii este de **homoplasmie**.

În cursul diviziunilor, distribuţia mitocondriilor în celulele-fiice se realizează *aleatoriu* (figura 13.1). În succesiunea generaţiilor de celule – somatice sau germinale – raportul dintre numărul mitocondriilor normale şi cel al mitocondriilor mutante este însă supus unor variaţii importante, datorate fenomenului derivei genetice. Variaţiile se pot solda cu *excluderea* totală a uneia dintre subpopulaţii. Procesul prin care se realizează reducerea de la heteroplasmie la homoplasmie se numeşte **segregare replicativă**.

Reducerea la homoplasmie a celulelor somatice necesită un număr mare de diviziuni. În linia germinală feminină, segregarea replicativă este însă foarte rapidă: după numai două generaţii, populaţiile mitocondriale ale celulelor germinale se omogenizează.

2. Biogeneza şi funcţiile mitocondriilor

La edificarea unei mitocondrii iau parte produşii proteici ai unui număr de aproximativ 3.000 de gene. În marea lor majoritate, aceste gene aparţin genomului nuclear. Sinteza proteinelor codificate de genele nucleare se efectuează pe ribozomii din citosol, de unde sunt transferate în mitocondrii.

În genomul mitocondrial se află doar **37 de gene** (28 în lanţul greu şi 9 în lanţul uşor), toate participând, prin produşii lor, la constituirea **lanţului respirator**, format din peste 100 de subunităţi proteice, dintre care doar 13 sunt codificate de genomul mitocondrial, restul fiind expresia genelor nucleare. În afară de cele 13 polipeptide, genele mitocondriale codifică 22 de tipuri de ARN de transfer şi două tipuri de ARN ribozomal. Moleculele de ARNmt participă la formarea propriului aparat de sinteză proteică, iar polipeptidele se constituie în subunităţi din componenţa a 4 din cele 5 complexe enzimatice ale lanţului respirator:

- *complexul I (NADH-dehidrogenaza)* reuneşte peste 40 de polipeptide, dintre care 7 sunt codificate de ADNmt;
- *complexul III (ubiquinol – citocrom c oxidoreductaza)* are în alcătuirea sa un singur polipeptid mitocondrial (citocromul b);
- *complexul IV (citocrom c oxidaza)* conţine 3 subunităţi mitocondriale (CoI, CoII, CoIII);
- *complexul V (ATP sintetaza)* are 13 polipeptide, două (ATP-azele 6 şi 8) fiind specificate de gene mitocondriale.

Ansamblul proteinelor care formează lanţul respirator rezultă aşadar prin complementarea a două agregate genice separate spaţial: nucleul şi mitocondriile. Prin urmare, bolile cauzate de defectele lanţului respirator pot fi consecinţa unor mutaţii care afectează:

- genele nucleare sau mitocondriale implicate în sinteza subunităţilor enzimatice individuale ale lanţului respirator;
- genele nucleare care asigură importul şi asamblarea diferitelor subunităţi ale lanţului respirator;

2. În mitocondrii funcţionează câteva dintre mecanismele de reparare a ADN nuclear – BER şi MGMT –, dar eficienţa lor este redusă şi rata mutaţiilor care persistă după intervenţia lor este de 10 ori mai mare decât în genomul nuclear (vezi capitolul 7.B.4).
3. Recent s-a demonstrat că genomul mitocondrial normal nu este uniform în toate celulele corpului, aşa cum se credea, ci are variaţii între diferite tipuri tisulare.

BCU CENTRAL UNIVERSITY IBRARY

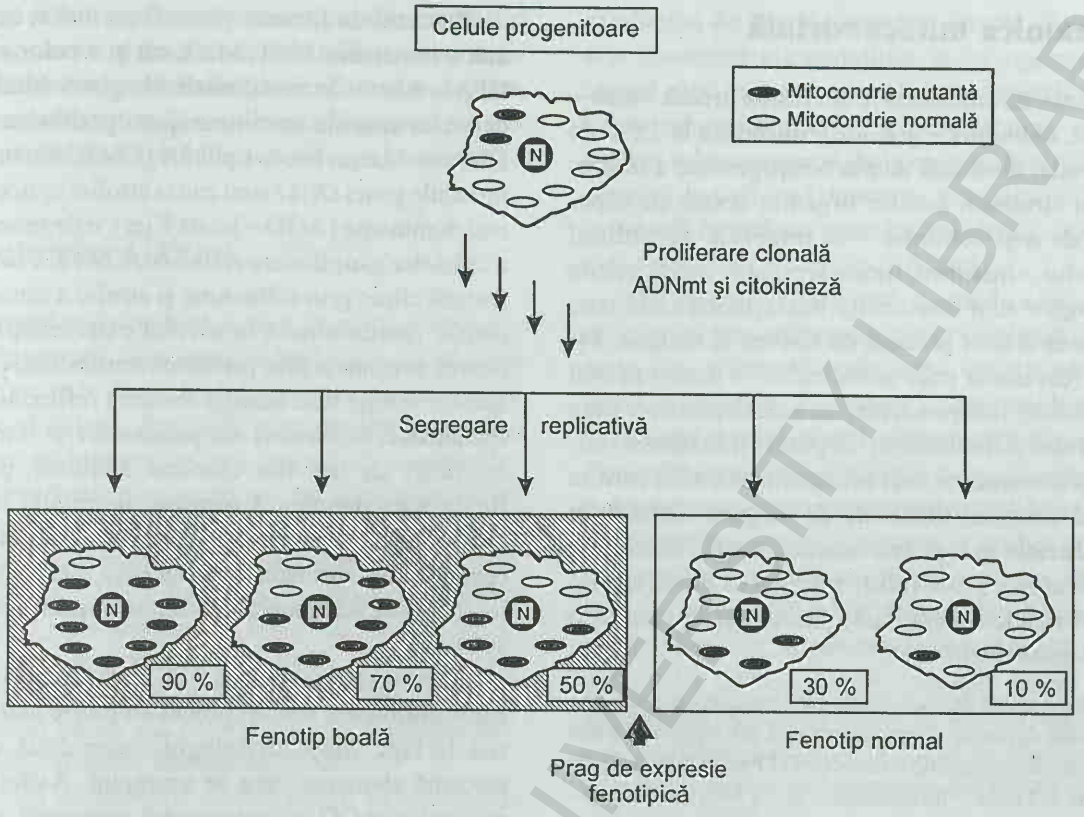


Figura 13.1. Segregarea replicativă a mutațiilor mitocondriale heteroplasmice

(după Nussbaum, McInnes şi Willard, 2001)

Împărțirea întâmplătoare a mitocondriilor normale şi mutante prin mitoze succesive determină o colecție de celule fiice cu proporții variabile ale celor două tipuri de mitocondrii. Atunci când predomină mitocondriile mutante se produce o disfuncție celulară şi tisulară care generează starea de boală

- genele nucleare care controlează perpetuarea, propagarea şi exprimarea genomului mitocondrial.

Dubla origine – nucleară şi mitocondrială – a componentelor lanțului respirator constituie explicația faptului că *transmiterea la descendenți* a defectelor acestui sistem se poate realiza atât matriliniar (pe linie maternă), cât şi în conformitate cu oricare dintre modurile mendeliene (autozomal dominant, autozomal recesiv, legat de X).

Genomul mitocondrial este lipsit de secvențe repetitive, genele care îl alcătuiesc nu au introni, iar procentul de ADN codant este foarte înalt (97%, față de numai 1,5% în genomul nuclear). Aceste *similitudini cu genomul procariotelor* justifică aserțiunea că ADNmt provine din cromozomii unor protobacterii aerobe primitive endocitate de celule eucariote mai mari (arhea), total dependente de glicoliza anaerobă pentru producerea cantității necesare de molecule macroergice ATP (teoria endosimbiotică). Odată încorporate (eveniment petrecut în urmă cu 1,5-2 miliarde de ani), protobacteriile şi-ar fi pierdut autonomia, multe dintre activitățile lor legate de generarea energiei fiind preluate şi controlate de genomul nuclear, fapt care explică *transmiterea multimodală a defectelor lanțului respirator*. Recent s-a demonstrat că, în evoluție, se produce un transfer natural al ADNmt în nucleu, producându-se copii (*numts*) ce devin secvențe ale genomului nuclear.

Întrucât toate cele 37 de gene mitocondriale sunt implicate în procesul fosforilării oxidative (OXPHOS), mitocondriile au fost asimilate unor *centrale energetice celulare*. Funcțiile mitocondriilor nu se limitează însă la generarea de energie. Ele îndeplinesc şi *alte roluri de importanță majoră* pentru realizarea unor variate activități celulare. Printre acestea figurează:

- controlul ciclului celular şi al proliferării;
- construcția şi funcționarea moleculelor de ADN;
- controlul biosintezei pirimidinelor (prin dihidrofolat dehidrogenază);
- sinteza hemului (prin sintetaza acidului delta-amino-levulinic necesar formării hemoglobinei);
- detoxificarea amoniacului în ciclul ureei;
- metabolizarea colesterolului şi sinteza sexosteroizilor;
- metabolizarea neurotransmițătorilor;
- producerea şi detoxificarea radicalilor liberi;
- oxidarea grăsimilor, proteinelor şi zaharurilor;
- homeostazia calciului
- inițierea apoptozei.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Dinamica mitocondrială

Denumirea de *mitocondrie* (în limba greacă *mitos* – filament, *chondros* – grăunte), introdusă în 1898 de Karl Benda, ilustrează ampla heterogenitate a morfologiei şi structurii acestor organite dotate cu capacitatea de a-şi schimba – la intervale de ordinul secundelor – mărimea, forma şi poziţia. *Modificările morfologice* sunt consecinţa desfăşurării simultane şi continue a unor procese de fisiune şi fuziune. **Fisiunea** (divizarea unei mitocondrii în două sau mai multe entităţi independente, cu subsecventa creştere a numărului şi diminuarea lungimii) şi **fuziunea** (cuplarea şi combinarea mai multor mitocondrii care se asociază formând filamente de lungimi variate) au roluri cruciale în reglarea funcţiei, controlul formei, comunicarea cu citosolul, recrutarea în diferitele compartimente subcelulare, precum şi în controlul calităţii mitocondriilor.

Aceste procese de remodelare sunt mediate de complexe proteice distincte. Fuziunea se află sub controlul a trei enzime mitocondriale cu funcţie GTPazică. Două dintre aceste GTPaze – mitofuzina 1 şi 2 (Mfn1 şi Mfn2) – sunt înglobate în membrana mitocondrială externă. A treia GTPază (numită OPA1 – *optic atrophy 1 protein*), situată în spaţiul intermembranar, este implicată în fuziunea membranelor mitocondriale interne. În controlul fisiunii intervine o altă GTPază, denumită DLP1 (*dynamin-like protein*) sau DRP1 (*dynamin-related protein*). Pentru a media fisiunea, DRP1 trebuie să fie recrutată din citoplasmă şi amplasată pe suprafaţa mitocondriilor, unde se asamblează în complexe oligomerice care secţionează tubulii mitocondriali. Genele care codifică mitofuzinele sunt situate pe cromozomii 3q26.33 (Mfn1) şi 1p36.22 (Mfn2), iar gena codificatoare a proteinei OPA1 îşi are sediul în regiunea 3q28-qter. Locusul genei care codifică proteina DRP1 se află pe cromozomul 12, în poziţia 12p11.21

Menţinerea funcţionalităţii mitocondriilor este condiţionată de stabilirea unui *echilibru dinamic între fuziune şi fisiune*. Mixarea conţinutului mitocondriilor, produsă în urma fuzionării, face posibilă complementarea proteinelor, repararea ADN şi distribuţia egală a metaboliţilor, iar prin fisiune se asigură segregarea egală a mitocondriilor în celulele fiice în cursul diviziunii şi deplasarea lor în lungul microtubulilor citoscheletului. Fisiunea contribuie, de asemenea, la izolarea segmentelor mitocondriale care au suferit alterări, promovând astfel *mitofagia*, o formă de autofagie prin care mitocondriile defective sunt selectiv degradate.

Perturbările proceselor de fuziune şi fisiune determinate de mutaţii ale genelor care le guvernează se constituie în cauze ale unor patologii complexe, printre care figurează şi unele dintre afecţiunile neurodegenerative majore: bolile Alzheimer, Parkinson şi Huntington.

Procesul de fuziune poate fi perturbat ca urmare atât a mutaţiilor Mtf1, Mtf2, cât şi a celor ale genei OPA1. Alterările mutaţionale ale genei Mtf2 se soldează cu apariţia unei neuropatii periferice – boala Charcot-Marie-Tooth tipul 2A (CMT2A), în timp ce mutaţiile genei *OPA1* sunt cauza atrofiei optice autozomal dominante (AOD – boala Kjer), o degenerescenţă a celulelor ganglionare retiniene. CMT2A se caracterizează clinic prin slăbiciune şi atrofie a musculaturii distale (predominant la nivelul extremităţilor inferioare), precum şi prin pierderea sensibilităţii. Uneori, acestor semne li se adaugă abolirea reflexelor osteotendinoase, deformări ale picioarelor şi – mai rar – implicări ale nervilor cranieni, scolioză, glaucom. Boala Kjer debutează insidios, de regulă în primii ani de viaţă (s-au descris şi forme cu debut tardiv), semnele fiind diminuarea progresivă a acuităţii vizuale, scotoame centrocecale, discromatopsia, atrofia nervului optic.

Surprinzător este faptul că mutaţiile a două gene care controlează acelaşi proces au efecte atât de diferite. În fapt, simptomatologiile celor două afecţiuni prezintă elemente care se suprapun. Astfel, la unii pacienţi cu AOD se înregistrează neuropatii periferice senzitivo-motorii, surditate sensorineurală, atrofie cerebrală, ataxie cerebeloasă, oftalmoplegie externă progresivă, miopatie mitocondrială, implicare psihiatrică. Similar, bolnavii cu CMT2A pot manifesta atrofie optică, surditate, disfuncţii cognitive, anomalii cerebrale şi cerebeloase, paralizie de corzi vocale, scolioză, parkinsonism, implicare psihiatrică. Suprapunerea simptomelor celor două boli în familiile cu mutaţii Mfn1 şi OPA1 demonstrează că ţesuturi diferite pot fi afectate în acelaşi mod.

Mutaţiile genelor care intervin în procesul de fisiune nu imprimă fenotipuri patologice transmisibile ereditar. S-a descris, totuşi, un caz de letalitate neonatală atribuită defectului genei Drp1. Simptomele au constat în atrofie optică, microcefalie cu dezvoltarea anormală a creierului, hipoplazie, nivele înalte ale acidului lactic în sânge şi lichidul cefalorahidian, supravieţuirea fiind de numai 37 de zile.

Produsul proteic al genei Mfn2 participă nu numai la formarea şi menţinerea reţelei mitocondriale, ci – aşa cum o demonstrează rezultatele investigaţiilor întreprinse în ultimii ani – şi la reglarea oxidării glucozei, partiţionarea acizilor graşi ce urmează a fi oxidaţi sau incorporaţi în trigiceride, reducerea consumului de oxigen, păstrarea în limite normale a sensibilităţii la insulină. S-a arătat că în musculatura striată a obezilor şi a pacienţilor cu diabet tipul 2, expresia genei Mtf2 este semnificativ redusă, ceea ce determină deteriorarea arhitecturii mitocondriilor, scăderea marcată a capacităţii oxidative (şi, implicit, a oxidării glucozei), emergenţa rezistenţei la insulină. Acest

din urmă defect este considerat a reprezenta elementul etiologic comun al ansamblului de tulburări care definesc **sindromul metabolic** (dislipidemia aterogenă, hipertensiunea arterială, intoleranța la glucoză, obezitatea centrală, starea proinflamatorie și protrombotică).

4. Mutațiile ADNmt

În genomul mitocondrial au fost identificate diferite tipuri de mutații: substituții, deleții și inserții ale unei singure perechi de nucleotide (mutații punctiforme), precum și deleții, duplicații și rearanjări interesând secvențe cu lungimi de sute sau mii de nucleotide.

Mecanismele producerii acestor alterări nu diferă de cele prin care sunt generate mutațiile genomului nuclear. Erorile inerente replicării (împerecheri greșite, derapaje ale ADN-polimerazei γ, aliniere ilegitimă a catenelor nou-sintetizate în raport cu catenele parentale) se fac răspunzătoare de apariția mutațiilor denumite *spontane*; leziunile ADN provocate de agenții din mediul intern sau extern – rămase nereparate – formează categoria mutațiilor *induse*.

În ceea ce privește consecințele lor, mutațiile ADNmt, similar celor nucleare, se clasifică în neutre, avantajoase și detrimentale.

Mutațiile neutre sunt lipsite de consecințe fenotipice importante și, ca atare, asupra lor nu se exercită presiunea selecției naturale. În marea lor majoritate, mutațiile neutre rezultă prin substituții mononucleotidice în poziția a treia a tripletelor codificatoare (cuvintele de cod) sau în regiunea necodantă (bucla D). Aceste mutații generează polimorfismele ADNmt, ce sunt puternic corelate cu originea etnică și geografică a populației investigate. Polimorfismele ADNmt sunt intens exploatate în prezent în domeniile paleoantropologiei, criminalisticii și medicinei legale.

Existența *mutațiilor avantajoase* este susținută de argumente circumstanțiale. Se consideră că variantele, care prin cuplare strânsă a respirației cu fosforilarea oxidativă, reduc producția de căldură și o cresc pe cea de ATP, sunt favorabile vieții la tropice. Invers, mutațiile care relaxează cuplarea, intensificând astfel termogeneza, ar fi avantajoase în regiunile arctice. Este foarte probabil ca selecția naturală să fi operat reținând, atunci când populațiile au migrat între Ecuator și Pol, mutațiile optime pentru anumite condiții climaterice și eliminându-le pe cele inadecvate. Variantele prezumate a conferi avantaj selectiv nu au fost încă identificate.

Mutațiile detrimentale conduc la apariția unor manifestări clinice a căror severitate diferă în funcție de *gradul heteroplasmiei, de tipul celulelor care le poartă* și *de gena afectată*.

În cazul mutațiilor heteroplasmice, relația dintre proporția moleculelor de ADN mutante și declinul producției de energie este una directă. Totuși, efectele fenotipice ale mutațiilor se fac resimțite numai atunci când eficiența globală a fosforilării oxidative scade sub un anumit nivel, denumit *prag energetic*, a cărui valoare variază de la un țesut la altul. Cel mai sensibil la deficitul energetic este sistemul nervos; urmează, în ordine, mușchii scheletici, inima, rinichii, glandele endocrine și ficatul.

Mai puțin clar este însă modul în care alterările diferitelor gene mitocondriale se corelează cu severitatea și – mai mult decât atât – chiar cu trăsăturile fenotipului patologic pe care îl imprimă. Este un fapt bine stabilit că există mai multe mutații răspunzătoare de apariția unui același fenotip și că o aceeași mutație poate imprima fenotipuri semnificativ diferite. Această disociere între genotip și fenotip se explică prin înaltul polimorfism al ADNmt, precum și prin intervenția unor factori modificatori epigenetici. Apare, așadar, evident faptul că, în patologia mitocondrială, stabilirea corelațiilor fenotip-genotip este, mai curând, iluzorie. Importantă este însă elucidarea mecanismului subiacent mutațiilor, ceea ce ar putea să explice de ce o aceeași mutație se face răspunzătoare de o amplă heterogenitate clinică.

Deoarece cele mai multe dintre mutațiile ADNmt se produc spontan și la o rată înaltă, majoritatea fiind polimorfisme neutre (lipsite de semnificație clinică), a fost propus un set de reguli canonice care fac posibilă definirea unei mutații ca fiind patologică, și anume:

- să nu fie prezentă la indivizii normali dintr-un același grup etnic;
- să altereze un situs ADNmt conservat în evoluție și, prin urmare, important din punct de vedere funcțional;
- să fie cauza deficienței uneia sau mai multor enzime OXPHOS;
- să existe o corelație între gradul de heteroplasmie și severitatea clinică.

O mențiune specială i se cuvine **depleției mitocondriale**. *Depleția* este termenul utilizat pentru a desemna *reducerea drastică* (uneori cu 98%) a cantității de ADNmt. Depleția se produce, de regulă, într-un singur organ (specificitate de țesut), căruia îi deteriorează profund și ireversibil capacitatea funcțională. Literatura conține exemple de depleții ale ADNmt din mușchi, rinichi, ficat și creier. Marea lor majoritate determină tulburări clinice de o gravitate extremă, instalate în primele săptămâni de la naștere și compatibile cu o supraviețuire de numai câteva luni. Cauzele depleției par a fi mutațiile unor gene autozomale, un exemplu constituindu-l gena factorului de transcriere NRF1 („*nuclear respiratory factor 1*"). Acest factor reglează transcrierea genelor nucleare care codifică proteinele mitocondriale. Prezența depleției ADNmt

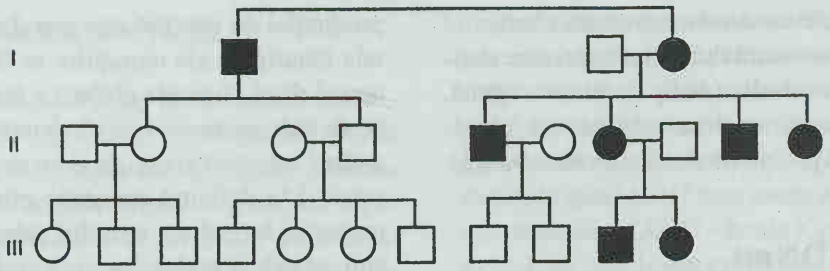


Figura 13.2. Arborele genealogic a unei boli mitocondriale cu transmitere maternă: femeile transmit boala la toți copii lor, iar bărbații bolnavi nu transmit boala

la mai mulți membri ai unei fratrii, indiferent de sexul lor, precum și absența semnelor la părinți indică natura recesivă a mutației cauzatoare.

5. Transmiterea la descendenți a mutațiilor ADNmt

Mutațiile produse în genele mitocondriale se transmit exclusiv pe linie maternă.

Exceptând câteva specii de Drosophila și de rozătoare, spermatozoizii nu contribuie cu citoplasma lor (în care se află un număr de numai 25-30 de mitocondrii) la formarea zigotului. Potrivit unor observații recente, celor câteva mitocondrii ale spermatozoizilor pătrunse ocazional în ovul în momentul fertilizării li se atașează molecule de ubiquitină, care le marchează în vederea distrugerii.

Rezultă că toate cele aproximativ 200.000 de mitocondrii prezente în citoplasma zigotului *aparțin ovulului* și, ca atare, celulele viitorului organism vor fi echipate numai cu mitocondrii materne. Consecința poate fi exprimată astfel: mamele își transmit genotipul mitocondrial copiilor de ambele sexe, dar numai fiicele lor îl vor transmite generației următoare (figura 13.2). În cazul în care femeia purtătoare a unei mutații mitocondriale are numai descendenți de sex masculin, mutația se va elimina din populație, deoarece bărbații nu pot asigura propagarea ei în succesiunea generațiilor.

De remarcat că mutațiile transmise ereditar (constituționale) sunt, de regulă, mutații punctiforme. Rearanjările, delețiile și duplicațiile par a nu fi tolerate de celulele germinale și, ca atare, nu se moștenesc. Se poate concluziona, așadar, că alterările masive sunt întotdeauna somatice și heteroplasmice, în timp ce mutațiile punctiforme, care pot fi atât moștenite (constituționale), cât și dobândite (somatice), se pot afla fie în starea de homoplasmie, fie în cea de heteroplasmie. Contribuția mutațiilor dobândite la generarea patologiilor mitocondriale este, cel mai adesea, subestimată, deoarece ele sunt prezente doar ca mozaicuri, putând deci rămâne nedetectate în ADNmt obținut din celulele sângelui periferic.

B. Principalele tipuri de boli mitocondriale

Principalele tipuri de boli mitocondriale produse de mutații ale ADNmt sau ale genelor nucleare ce contribuie la funcția mitocondriilor sunt sintetizate în tabelul 13.1.

1. Manifestările clinice ale afecțiunilor mitocondriale

Principalele elemente care sugerează implicarea alterării funcțiilor mitocondriilor în etiopatogenia unei boli sunt:

- caracterul *necoerent* al asocierii semnelor și simptomelor clinice;
- debutul cel mai adesea *precoce* și evoluția *rapidă, progresivă*;
- *afectarea concomitentă a cel puțin trei organe* care nu au în comun nici originea embriologică și nici funcțiile biologice;
- *modificările recurente* survenite în tabloul clinic cu ocazia unor infecții (ameliorări, agravări);
- prezența în tabloul clinic a unor combinații de *trăsături atipice*, inexplicabile.

Perturbările procesului fosforilării oxidative antrenează – virtual – *disfuncții ale oricărui organ* sau *țesut*. Ele pot afecta țesuturile individual sau în diferite combinații. În plus, mutații diferite ale ADNmt pot produce manifestări clinice similare, iar o aceeași mutație poate imprima fenotipuri morbide variate. Studii efectuate pe familii în care s-au decelat mutații heteroplasmice ale ADNmt demonstrează că pe măsura creșterii proporției de ADNmt mutant are loc o *reducere*

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.1. Clasificarea bolilor mitocondriale umane în funcție de mutațiile cauzatoare

Bolile primare ale ADN mitocondrial		**Modelul transmiterii**
Deleții, duplicații și rearanjări mari	Oftalmoplegia externă cronică progresivă (CPEO)	S sau M
	Sindromul Kearns-Sayre	S sau M
	Diabet și surditate	S
	Sindromul Pearsons	S sau M
	Tubulopatia sporadică	S
Mutații punctiforme	**Gene codificatoare ale proteinelor**	
	LHON (*G11778A, T14484C, G3460A*)	M
	NARP/Sindrom Leigh (*T8993G/C*)	M
	Genele ARN de transfer	
	MELAS (*A3243G, T3271C, A3251G*)	M
	MERRF (*A8344G, T8356C*)	M
	CPEO (*A3243G, T4274C*)	M
	Miopatie (*T14709C, A12320G*)	M
	Cardiomiopatie (*A3243G, A4269G, A4300G*)	M
	Diabet și surditate *(A3243G, C12258A*)	M
	Encefalomiopatie *(G1606A, T10010C*)	M
	Gene ale ARN ribozomal	
	Surditatea senzorineurală nonsindromică *(A7445G*)	M
	Surditatea nonsindromică indusă de glicozide	M
Boli genetice nucleare[4]		**Modelul transmiterii**
Anomalii ale mentenanței ADNmt	**Oftalmoplegia externă progresivă autozomal dominantă**	
	Mutații ale translocatorului adenin nucleotidelor (*ANT1*)	AD
	Mutații ale ADN polimerazei delta *(POLG1*)	AD sau AR
	Encefalomiopatia neurogastrointestinală (cu multiple deleții ADNmt).	
	Mutații în gena timidin fosforilazei	AR
	Miopatia cu depleție ADNmt: Mutații ale genei timidin kinazei	AR
	Encefalopatia cu insuficiență hepatică: Mutații în gena dezoxiguanozin kinazei *(DGUOK*)	AR
Anomalii primare ale lanțului respirator	**Sindromul Leigh**	
	Deficiența complexului 1 – mutații ale subunităților complexului 1 *(NDUFS2,4,7,8* și *NDUFV1*)	AR
	Deficiența complexului 2 – mutații ale subunității flavoproteină (*SDHA)*	AR
	Leucodistrofie și epilepsie mioclonică:deficiența complexului 1 – mutații ale subunității *NDUFV1*	AR
	Cardioencefalomiopatie: Deficiență a complexului 1, subunitatea *NDUFS2*	AR
	Atrofie optică și ataxie: deficiența complexului 2, subunitatea flavoproteină (*SDHA*)	AD
Anomalii ale importului de proteine mitocondriale	Distonie-surditate: Mutații ale proteinei DDP1 *(TIMM8)*	XLR
Anomalii ale asamblării lanțului respirator	**Sindromul Leigh**	
	Deficiența complexului IV – mutații ale proteinei de asamblare a COX *(SURF1)*	AR
	Deficiența complexului IV – mutații ale proteinei de asamblare a COX (*COX10)*	AR
	Cardioencefalomiopatie: deficiența complexului IV – mutații ale proteinei de asamblare COX (*SCO2*)	AR

4. S-au descries mutații în 170 de gene nucleare care produc boli mitocondriale deoarece aceste gene codifică ARN și proteine necesare structurii și funcției mitocondriei.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bolile primare ale ADN mitocondrial		Modelul transmiterii
Anomalii ale asamblării lanțului respirator	**Insuficiență hepatică și encefalopatie**	
	Deficiența complexului IV – mutații ale proteinei de asamblare COX *(SCO1)*	AR
	Deficiența complexului IV – mutații ale proteinei care afectează stabilitatea ARNm *(LRPPRC)*	AR
	Tubulopatie, encefalopatie, insuficiență hepatică: Deficiența complexului III – mutații ale asamblării complexului III *(BSC1L)*	AR
	Encephalopathy: Complex I deficiency - mutations in the complex I assembly protein *(B17.2L)* Encefalopatie: deficiența complexului I	AR
Anomalii ale metabolismului ARN	**Sindromul Leigh**	
	Deficiența complexului IV*(LRPPRC)*	AR
	Defecte ale mai multor complexe *(EFG1)*	AR
Anomalii ale membranei lipidice	Ataxia, convulsii, miopatie Deficiența coenzimei Q10 *(COQ2)*	AR
	Sindromul Barth (Taffazzin)	AR

1.M = matern; 2. S = sporadic; 3. AD = autozomal dominant; 4. AR = autozomal recesiv XLR = recesiv legat de X

a producției de energie, iar când este atins un anumit *prag*, variabil în funcție de țesut, *criza energetică* determină declanșarea manifestărilor patologice. Valoarea pragului depinde de mai mulți factori: declinul producției de energie, creșterea producției speciilor reactive de oxigen, inițierea apoptozei care, depletând țesuturile, compromite funcționalitatea acestora. Diferența între celulele normale și cele defective în ceea ce privește funcția mitocondrială este minimă, instalarea bolii producându-se atunci când proporția de ADNmt mutant atinge 85%.

Semnele de debut pot apărea în orice moment al ontogenezei – din perioada antenatală până la vârsta adultă –, iar spectrul simptomelor de debut al bolilor mitocondriale este foarte larg (tabelul 13.2).

După un interval de timp relativ scurt, semnelor inițiale li se adaugă – invariabil – cele ale *afectării neuromusculare*. În general, semnele prezente la debut persistă și se agravează gradual. Uneori însă, ele pot regresa, chiar până la dispariție, odată cu dezvoltarea unei simptomatologii care exprimă suferința altor organe. Astfel, diareea, pancitopenia sau insuficiența hepatică se pot remite atunci când în prim-planul manifestărilor clinice se plasează semnele deficitului neuromuscular. De notat că, drept urmare a acumulării de ADNmt mutant și a segregării replicative, în fenotipul unui bolnav se pot înregistra variații importante, mergând de la înrăutățirea dramatică a manifestărilor clinice până la completa conversie a afecțiunii. Un exemplu îl constituie **sindromul Pearson** (produs de deleții ale ADNmt din celulele sangvine), caracterizat prin anemie sideroblastică și insuficiență pancreatică exocrină. Bolnavii care supraviețuiesc până în a doua decadă a vieții dezvoltă adesea **sindromul Kearns-Sayre** (produs de acumularea de deleții ale ADNmt în mușchi și alte țesuturi), între ale cărui simptome nu se includ anemia și deficitul enzimelor pancreatice.

Principalele tipuri de boli mitocondriale, mutațiile ADNmt care le determină și codul OMIM care oferă informații complete și actualizate sunt prezentate în tabelul 13.3.

Se acceptă că există cinci categorii majore de afecțiuni, definite molecular, determinate de mutații ale ADNmt (*citopatii mitocondriale*).

Oftalmoplegia externă cronică progresivă (CPEO) și sindromul Kearns-Sayre (KSS)

- *CPEO* debutează prin ptoză palpebrală, inițial unilaterală, dar care se bilateralizează în câteva luni sau după câțiva ani, oftalmoplegie, tulburări miopatice și atrofii la nivelul musculaturii mimicii, gâtului, umărului și membrelor. Unii bolnavi prezintă cataractă, surditate, ataxie, hipogonadism, parkinsonism, intoleranță la efort. La examenul histologic al fragmentelor de mușchi scheletici recoltate prin biopsie se observă aspectul care definește cele mai multe dintre encefalomiopatiile mitocondriale: *fibrele musculare roșii în lambouri*. Acest aspect este generat de proliferarea anormală a mitocondriilor, consecutivă defectelor biochimice severe ale fosforilării oxidative.
- *Sindromul Kearns-Sayre (KSS)*, considerat a fi forma severă a CPEO, se caracterizează prin retinopatie pigmentară bilaterală, oftalmoplegie externă cu limitarea sau absența mișcărilor globilor oculari, diabet zaharat, intoleranță la glucoză, deficiența hormonului de creștere și, implicit, hipostatură, întârzierea dezvoltării pubertare, hipoparatiroidie, surditate, disfagie, ataxie cerebeloasă, bloc

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.2. Diversitatea simptomelor bolilor mitocondriale şi relaţia cu vârsta de debut

Organ	Perioada neonatală (0-1 lună)	Copilărie (o lună-12 ani)	Adolescenţă, vârsta de adult
SNC	Hipotonie Acidoză lactică Comă acidocetozică	Retard psihomotor Ataxie cerebeloasă Mioclonie Pseudoaccidente vasculare cerebrale Encefalomiopatie necrozantă subacută Epilepsie	Mioclonie Ataxie cerebeloasă Manifestări extrapiramidale Spasticitate Retard psihomotor Leucodistrofie Atrofie corticală Neuropatie periferică
Musculatura striată	Miopatie Atrofie musculară	Miopatie Atrofie musculară Slăbiciune musculară Hipotonie Mialgie Intoleranţă la efort Mioglobinurii recurente	Miopatie progresivă Slăbiciune musculară Mialgie Intoleranţă la efort Mioglobinurii recurente
Ficat	Insuficienţă hepatică	Hepatomegalie Disfuncţie hepatocelulară	Hepatopatii
Inimă	Cardiomiopatie hipertrofică	Cardiomiopatie hipertrofică Defecte de conducere sau de generare a impulsurilor	Cardiomiopatie concentrică hipertrofică sau dilatativă Bloc cardiac Insuficienţă ventriculară stângă
Rinichi	Tubulopatie proximală (sindrom Toni-Debre-Fanconi)	Tubulopatie proximală (sindrom TDF)	
Aparat digestiv		Vomă, diaree Atrofie a vilozităţilor intestinale Insuficienţă pancreatică exocrină	
Sistem endocrin		Hipostatură Hipoglicemie	Diabet Hipoparartiroidie Hiperaldosteronism Amenoree Pubertate întârziată
Sistem hematopoietic		Anemie sideroblastică Neutropenie, trombopenie	Anemie sideroblastică
Analizatorul auditiv		Surditate neurosenzorială	Surditate neurosenzorială Tinitus
Analizatorul vizual		Atrofie optică Oftalmoplegie externă progresivă Retinită pigmentară Ptoză palpebrală Cataractă	Oftalmoplegie externă progresivă Ptoză palpebrală Atrofie optică Leber Glaucom Retinită pigmentară Cataractă
Piele		Pigmentaţie anormală a regiunilor expuse la soare Păr uscat şi friabil Tricotiodistrofie	

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.3. Boli cauzate de defecte ale funcției mitocondriale și de mutații ale ADNmt

Boala	Mutații	OMIM
Oftalmoplegia externă cronică progresivă (CPEO) Sindromul Kearns-Sayre (KSS) Miopatii oculare Cardiomiopatii ereditare	Deleții Deleții Rearanjări	^ 555000 # 530000
Miopatie, encefalomiopatie, acidoză lactică, accidente cerebrale vasculare (*myopathy, encephalomipathy, lactic acidosis, stroke* – MELAS)	ARNt ^{leu}A→G 3243	# 540000
Epilepsia mioclonică cu fibre musculare roșii în lambouri (*Myoclonic epilepsy and ragged red fibers* – MERFF)	ARNt ^{lys}A→G 8344	# 545000
Boala Leigh și slăbiciunea musculară neurogenică, ataxia și retinita pigmentară (*neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa* – NARP)	T→G 8993; T→C 8993	+ 516060
Neuropatia optică ereditară Leber (*Leber hereditary optic neuropathy* – LHON)	Multiple	# 535000 * 516000
Ototoxicitatea aminoglicozidică (*aminoglycoside ototoxicity*)	A→G 1555	* 580000
Encefalomiopatia progresivă	Δ^{β}271	* 590050/60
Boala Alzheimer cu debut tardiv, boala Parkinson	ARNt ^{glu}A→G 4336	# 502500

atrioventricular (răspunzător de producerea sincopelor, a intoleranței la efort, a bradicardiei și a morții subite). Investigațiile biochimice evidențiază creșteri ale metabolismului anaerob exprimate prin creșterea nivelelor lactat/piruvat și reducerea raportului ATP/ADP. Afecțiunea debutează înaintea vârstei de 20 de ani, iar moartea se produce înaintea vârstei de 30-40 de ani.

Ambele sindroame sunt consecința unei deleții unice mari (8 kb) a ADNmt.

Sindromul MELAS (*Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic acidosis, Stroke-like episodes*) este o boală multisistemică în care, pe lângă semnele cardinale desemnate prin acronimul MELAS, există o amplă varietate de anomalii clinice, dintre care cele mai frecvente sunt: hipostatura, surditatea, cefaleea, convulsiile generalizate, episoadele de vomă, ptoza palpebrală, oftalmoplegia externă, semnele extrapiramidale (coree, parkinsonism, calcificarea ganglionilor bazali), pancreatita, sindromul nefrotic, lipoamele. La peste 80% dintre pacienți se detectează mutații punctiforme în gena ARNt$^{Leu(UUR)}$ în pozițiile nucleotidice 3243 și 3271.

Epilepsia mioclonică cu fibre musculare roșii în lambouri (*myoclonic epilepsy with ragged-red fibers* – **MERFF**) se definește prin mioclonie intensă, ataxie progresivă, slăbiciune musculară, intoleranță la efort, crize de convulsii generalizate, atrofie optică, surditate, demență, acidoză lactică, ictusuri cerebrale recurente. Mutația care determină MERFF este o tranziție A®G la situsurile 8344 sau 8356 din gena pentru ARNt^{LYS}.

Neuropatie, ataxie, retinită pigmentară (NARP)/ boala Leigh cu transmitere maternă. Sindromul **NARP** include: întârziere a creșterii postnatale, detresă respiratorie cu crize de apnee, slăbiciune la nivelul mușchilor proximali ai membrelor, diminuarea reflexelor achileene, neuropatii senzoriale cu amauroză și surditate, ataxie, convulsii, retinită pigmentară, demență. La bolnavii cu *NARP* se detectează o mutație punctiformă în poziția 8993 a genei ce codifică subunitatea 6 a ATP-sintetazei. Când proporția celulelor mutante este foarte înaltă, se constituie fenotipul encefalopatiei necrozante subacute, cunoscută sub numele de **boala Leigh**.

Neuropatia optică ereditară Leber (LHON). Boala debutează dramatic prin semne de nevrită retrobulbară nedureroasă acută sau subacută. Pierderea vederii se instalează brusc și este, în 50% din cazuri, unilaterală; afectarea celuilalt ochi este însă obligatorie și se produce în interval de aproximativ o lună. 70% dintre bolnavi sunt bărbați, ceea ce a condus la ipoteza, neconfirmată însă, a intervenției adiționale a unei gene de pe cromozomul X. Vârsta medie de debut este de 30 de ani. Aspectul de papilită este prezent de la începutul bolii; atrofia optică nu reprezintă totuși niciodată un semn precoce; dezvoltarea ei este progresivă și devine completă doar la două treimi dintre bolnavi. În unele cazuri, tabloul clinic include, pe lângă manifestările oftalmologice, diferite alte tulburări: neuropatii periferice, distonie, mielopatie demielinizantă, defecte de conducere cardiacă, tulburări urinare și sexuale. Mutațiile 3460 și 11778A (de la nivelul genelor ND1 și ND4, imprimă un caracter de gravitate, în timp ce forma indusă de mutația 14484 este mai blândă, compatibilă chiar cu redobândirea parțială a vederii. Examenele de laborator evidențiază creșteri difuze ale numărului și dimensiunii

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mitocondriilor. Fibrele musculare roşii în lambouri sunt absente, iar miofibrilele sunt prezervate.

Miopatia cu oftalmoplegie externă, neuropatie gastrointestinală, encefalopatie (MNGIE). Afecțiunea este cauzată de mutațiile genei codificatoare a timidin fosforilazei, o enzimă care catalizează fosforoliza timidinei. Transmiterea este recesiv autozomală. Gena este situată pe cromozomul 22q13.32-qter, iar mutațiile ei reduc sau abolesc activitatea timidin fosforilazei, consecința fiind creşterea nivelului celular al timidinei. Excesul de timidină este detrimental pentru mentenanța şi repararea ADNmt care va deveni instabil şi va acumula mutații ce vor conduce la imprimarea fenotipului patologic. Semnele şi simptomele se instalează în jurul vârstei de 20 de ani. Mai frecvente şi mai severe sunt suferințele sistemului digestiv. Neuropatia gastrointestinală produce dismotilitate, ceea ce împiedică deplasarea în lungul tubului digestiv a

Tabelul 13.4. Boli mitocondriale mai frecvent întâlnite

Boala	Trăsături clinice	Trăsături adiționale
Oftalmoplegia externă cronică progresivă	Oftalmoplegie externă Ptoză bilaterală	Miopatie proximală moderată
Sindromul Kearns-Sayre	Debut prin oftalmoplegie externă progresivă înaintea vârstei de 20 de ani Retinită pigmentară Ataxie cerebeloasă, blocuri cardiace	Surditate bilaterală Miopatie Disfagie Diabet zaharat, Hipoparatiroidism Demență
MELAS	Ictusuri cerebrale înaintea vârstei de 40 de ani Convulsii şi/sau demență Slăbiciune musculară proximală simetrică Ptoză palpebrală Fibre musculare roşii în lambouri şi/sau acidoză lactică	Diabet zaharat Cardiomiopatie Surditate bilaterală Retinopatie pigmentară Ataxie cerebeloasă Semne extrapiramidale: coree, parkinsonism Hipostatură Pancreatită Sindrom nefrotic Lipoame
Epilepsie mioclonică cu fibre musculare roşii în lambouri (MERF)	Mioclonii Convulsii Ataxie cerebeloasă Miopatie	Demență Atrofie optică, surditate bilaterală Neuropatie periferică, spasticitate Diabet Lipoame simetrice multiple
Neuropatia optică ereditară Leber (LHON)	Pierderea bilaterală a vederii, nevrită retrobulbară nedureroasă Raportul bărbați:femei – 4:1 Vârsta medie de debut – 23 de ani	Distonie Sindroame de preexcitare cardiacă
Neuropatie, ataxie şi retinită pigmentară (NARP)	Neuropatie periferică cu debut în adolescență sau la adult Ataxie cerebeloasă Retinopatie pigmentară Demență Convulsii	Calcificări ale ganglionilor bazali Electroretinogramă anormală Neuropatie sensorimotorie
Sindromul Leigh	Encefalopatie subacută Semne ale afectării cerebelului şi ale trunchiului cerebral	Calcificări în ganglionii bazali Istoric matern de afecțiuni neurologice
Miopatia infantilă şi acidoza lactică (forme letale şi neletale)	Hipotonie în primul an de viață Dificultăți în alimentație şi respirație	Forma fatală poate fi asociată cu cardiomiopatie şi/sau cu sindrom Toni-Debre-Fanconi
Sindromul Pearson	Anemie sideroblastică Pancitopenie Insuficiență pancreatică exocrină	Defecte tubulare renale

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.5. Tulburări asociate cu citopatiile mitocondriale

Organ/sistem	Simptome asociate
Creier	Întârzieri ale dezvoltării, retard mental, tulburări neuropsihice, demenţă, crize comiţiale, mioclonii, tulburări ale motilităţii (distonie, diskinezie, coree), paralizie cerebrală atipică, migrene, ictusuri cerebrale
Nervi	Slăbiciune, durere neuropatică, absenţa reflexelor, probleme gastrointestinale (reflux gastroesofagian, golire gastrică întârziată, constipaţie, pseudo-obstrucţie), lipotimii, transpiraţie absentă sau excesivă cu afectare a termoreglării
Muşchi scheletici Muşchi oculari extrinseci	Slăbiciune, hipotonie, crampe, dureri musculare Ptoză, strabism dobândit, oftalmoplegie
Rinichi	Tubulopatie proximală cu pierderi de proteine, magneziu, fosfor, calciu etc.
Inimă	Defecte de conducere (blocuri), cardiomiopatii
Ficat	Hipoglicemie, insuficienţă hepatică
Analizator vizual	Reducerea sau pierderea vederii (retinită pigmentară, atrofie optică)
Analizato auditiv	Deficit al auzului, surditate
Pancreas	Diabet şi insuficienţa secreţiei exocrine
Sistemice	Falimentul creşterii, hipostatură, oboseală, probleme respiratorii

Tabelul 13.6. Trăsături clinice asociate cu citopatiile mitocondriale

Trăsătura clinică	CPEO/ KSS	MELAS	MERRF	NARP	LHON
Oftalmoplegie	+	±	?	?	?
Degenerescenţă retiniană	+	?	?	?	?
Retinită pigmentară	?	?	?	+	?
Atrofie optică	?	?	?	?	+
Blocuri cardiace	+	?	?	?	?
Mioclonii	?	?	+	+	?
Ataxie	+	?	+	+	?
Slăbiciune	+	+	+	+	?
Crize comiţiale	?	+	+	+	?
Demenţă	+	+	+	+	?
Hipostatură	+	+	+	?	?
Episoade de vomă	?	+	?	?	?
Cecitate corticală	?	+	?	?	?
Hemipareză, hemianopsie	?	+	?	?	?
Surditate sensorineurală	+	+	?	+	?
Neuropatie	±	±	±	+	?
Acidoză lactică	+	+	+	±	?
Fibre musculare roşii în lambouri	+	+	+	?	?
Istoric familial pozitiv	?	+	+	+	+

Tabelul 13.7. Manifestări sistemice ale bolilor mitocondriale

Metabolice	Acidoza lactică, coma cetoacidozică
Hepatice	Hepatopatie, insuficienţă funcţională
Cardiace	Cardiomiopatie, defecte de conducere
Renale	Tubulopatii proximale şi distale, glomerulopatii
Intestinale	Diaree, atrofie viloasă, sindrom pseudoobstructiv
Pancreatice	Disfuncţie a acinilor
Endocrine	Hipertiroidie, diabet zaharat, hipostatură
Oftalmologice	Cataractă, retinopatie pigmentară

RO IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.8. Rezultate posibile ale explorărilor paraclinice în citopatiile mitocondriale

Histologie	Fibre musculare roşii în lambouri
Histochimie	Proliferarea excesivă a mitocondriilor şi deficienţele citocrom c oxidazei
Microscopie electronică	Anomalii morfologice ale mitocondriilor
Electromiografie	Potenţiale miopatice
Audiogramă	Surditate senzorială
Electrocardiogramă	Defecte de conducere
Biochimie	Raport molar lactat/piruvat crescut (>20) în ser şi în LCR; hiperlactatemie >3mm/l sau >1,5mm/l în LCR; acidoză metabolică (bicarbonaţi plasmatici crescuţi). Polarografia permite stabilirea consumului de oxigen. Hiperglicemia indică prezenţa unui diabet asociat.
Neuroimagistică (TC,RMN)	Calcificări în ganglionii bazali, atrofie difuză şi/sau focală a cortexului şi cerebelului
Analiza ADNn şi ADNmt	Mutaţii, deleţii, duplicaţii în celulele sanguine sau din fibrele muşchilor scheletici Pot fi evidenţiate mutaţii în genomul nuclear sau în cel mitocondrial.

nutrienţilor ingeraţi. Ca urmare, saţietatea apare după ingestia unor cantităţi mici de hrană. Disfagia, greaţa, vărsăturile, durerile abdominale, diareea, malabsorbţia, episoadele pseudo-obstructive intestinale şi gastropareza sunt simptomele prezente la 100% dintre bolnavi. Problemele gastrointestinale conduc la pierderea în greutate şi la reducerea masei musculare (caşexie). Neuropatia periferică se face răspunzătoare de tulburările senzitive, slăbiciunea şi durerile musculare, abolirea reflexelor osteotendinoase. Manifestările oculare constau în oftalmoplegie externă, ptoză palpebrală, degenerare retiniană, atrofie optică. Pierderea auzului se înregistrează la 60% dintre cei afectaţi. Ocazional se notează blocuri incomplete de ramură. Analizele de laborator evidenţiază acidoza lactică, nivele crescute ale timidinei plasmatice (de 20 de ori mai înalte), ale dezoxiuridinei şi dezoxitimidinei. Evoluţia este progresivă, decesul survenind, în medie, la 38 de ani.

Tabelul 13.4 prezintă sinoptic trăsăturile clinice ale celor mai frecvente sindroame clinice produse de mutaţiile ADNmt, iar în tabelul 13.5 simptomele prezente în diferite citopatii mitocondriale sunt grupate pe organe şi sisteme.

Unele dintre trăsăturile fenotipice imprimate de diferitele mutaţii ale ADNmt sunt comune mai multor entităţi nosologice incluse în categoria citopatiilor mitocondriale. Suprapunerea semnelor clinice este redată în tabelul 13.6, iar în tabelul 13.7 sunt prezentate manifestările sistemice ale citopatiilor mitocondriale.

Cel mai adesea, manifestările clinice iniţiale ale citopatiilor mitocondriale exprimă suferinţa unui singur organ. Nici una dintre manifestările de debut nu este de natură să orienteze asupra implicării în patogenia bolii a unui defect mitocondrial. Asocierea ulterioară a semnelor afectării altor aparate şi sisteme impune efectuarea unor *examene paraclinice* ale căror rezultate pot documenta posibila disfuncţie mitocondrială (vezi tabelul 13.8). *Testul decisiv de diagnostic îl constituie însă analiza moleculară a ADNmt.*

C. Alte consecinţe ale mutaţiilor ADNmt

1. Mutaţiile ADNmt şi senescenţa

Senescenţa se asociază cu diminuarea masei şi forţei musculare, ceea ce compromite autonomia funcţională a activităţilor motorii şi reduce calitatea vieţii. Diminuarea progresivă a musculaturii scheletice – denumită *sarcopenie* – afectează 10-25% dintre indivizii sub 70 de ani şi 40% dintre cei de peste 80 de ani. În muşchii scheletici ai vârstnicilor se constată o creştere a disfuncţiilor mitocondriale şi a stresului oxidativ cauzată de declinul capacităţii de generare a ATP prin procesele fosforilării oxidative. Defectele LTE (lanţul transportului de electroni) se manifestă pleiotropic, deficitul de ATP fiind evidenţiabil în toate ţesuturile senescente alcătuite din celule diferenţiate terminal (postmitotice). Declinul producţiei de ATP se corelează atât cu instalarea şi progresia semnelor senescenţei, cât şi cu acumularea de alterări mutaţionale ale ADNmt. De reţinut că antrenamentul în sălile de forţă s-a dovedit a fi capabil să contracareze slăbiciunea musculară asociată cu îmbătrânirea. Este, în prezent, unanim acceptat că antrenamentul ameliorează funcţiile musculare şi poate suscita diminuarea markerilor stresului oxidativ şi îmbunătăţirea activităţilor mitocondriale.

BCU IAŞI / CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

În celulele sistemului nervos central ale indivizilor vârstnici a fost decelată o deleție de 5 Kb. Cea mai înaltă proporție de molecule ADNmt deletate se înregistrează în substanța neagră, nucleul caudat și putamen. La vârsta de 85 de ani această mutație este detectată în peste 10% din neuronii nucleilor bazali; ea afectează și alte zone ale encefalului, dar lipsește din neuronii cerebelului. În fibrele mușchilor scheletici, pe lângă deleția de 5 Kb, la persoanele vârstnice se decelează și o deleție de 3 Kb, precum și o acumulare de mutații punctiforme. Alterările mutaționale sunt prezente numai în fibrele musculare adulte, celulele satelite (miogenice) fiind exceptate de mutații. După vârsta de 35 de ani, în fibrele miocardice încep, de asemenea, să se acumuleze mutații, reprezentate cu precădere de deleția unui segment cu o lungime de 3,6 Kb.

Incriminate în producerea mutațiilor ADNmt sunt speciile reactive de oxigen. Nivelul crescut al 8-hidroxiguanozinei în ADNmt este consecința stresului oxidativ la care este expus permanent genomul mitocondriilor. Proporția de 100-300 ori mai înaltă a moleculelor cu deleții în ganglionii bazali ai bătrânilor se explică prin faptul că aceste formațiuni sunt foarte bogate în fibre dopaminergice; dezaminarea oxidativă a dopaminei de către monoaminooxidază produce o mare cantitate de radicali liberi. În boala coronariană, alternanța ischemie-reperfuzie stimulează producerea speciilor reactive de oxigen.

Prin intermediul mutațiilor pe care le determină, radicalii liberi se constituie în cauza majoră a deteriorării progresive a mecanismelor mitocondriale implicate în metabolismul energetic. Acumularea în exces a mutațiilor mitocondriale și dezechilibrul subsecvent între necesarul de energie al celulelor și posibilitatea asigurării acestuia se află la originea bolilor degenerative ale vârstei a treia.

2. Mutațiile ADNmt în bolile neurodegenerative

O amplă varietate de mutații ale ADNmt a fost repertoriată în bolile degenerative ale creierului, mușchilor scheletici, inimii, rinichilor și sistemului endocrin. În general, persoanele care moștenesc mitocondropatii nu prezintă modificări fenotipice în perioada postnatală, ci dezvoltă boala în copilărie, adolescență sau la maturitate, vârsta de debut fiind dependentă de severitatea mutației care le-a fost transmisă matriliniar. În cazul mutațiilor somatice (dobândite), debutul se produce atunci când eficiența globală a fosforilării oxidative scade sub pragul energetic. Odată instalată, afecțiunea suferă un declin progresiv, ca urmare a acumulării, asociată cu înaintarea în vârstă – a mutațiilor în țesuturile postmitotice. După cum s-a menționat mai sus, pragul energetic cel mai jos situat se află în țesutul nervos care, pe cale de consecință, este și cel mai sensibil la deficitul energetic; urmează, în ordine, mușchii scheletici, inima și rinichiul, glandele endocrine și ficatul. Acesta este motivul pentru care cele mai frecvente afecțiuni degenerative asociate cu defectele mitocondriale se manifestă la nivelul sistemului nervos.

Disfuncția mitocondrială exercită un rol major în patogeneza **bolii Parkinson** (BP), o afecțiune neurodegenerativă cronică, progresivă și, cel mai adesea, devastatoare, a cărei simptomatologie include tremor, rigiditate, bradikinezie și instabilitate posturală. Instalarea semnelor clinice este consecința deteriorării funcției mitocondriale care provoacă creșterea stresului oxidativ și, totodată, a vulnerabilității neuronilor la procesul citotoxicității. Cei mai expuși sunt neuronii dopaminergici din regiunea nigrostriatală, în care au fost identificate deficiențe ale complexului I și leziuni oxidative, prezente și în cibrizii realizați din celulele patologice. *Cibrizii* sunt celule himerice, formate prin fuzionare. Nucleii acestor celule provin de la indivizi aparent sănătoși, iar citoplasma – de la bolnavi cu afecțiuni mitocondriale. Raportul ADNmt mutant/ADNmt normal este, în medie, de 10 ori mai înalt la bolnavi comparativ cu martorii sănătoși. Răspunzătoare de perturbarea metabolismului energetic este considerată a fi deleția de 5 Kb a ADNmt, detectabilă mai ales în neuronii nucleilor bazali.

> Implicarea alterărilor mitocondriale în patogeneza BP a devenit evidentă în 1983, când toxicomanii care își injectau MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine), un derivat sintetic similar heroinei, au dezvoltat trăsăturile caracteristice bolii Parkinson. MPTP este o toxină care inhibă complexul I al lanțului respirator și care, administrată animalelor de laborator, determină pierderea selectivă a neuronilor dopaminergici din substanța neagră (o lamă de substanță pigmentată din pedunculii cerebrali, în care se află pericarionii neuronilor dopaminergici) și implicita instalare a tulburărilor parkinsoniene.

Între 75 și 90% dintre cazurile de BP sunt sporadice, restul de 10-25% fiind forme familiale, în a căror etiopatogenie intervin mutații ale unor gene nucleare, unele cu transmitere autozomal dominantă (*PARK1, 3, 4, 5, 8; NR4A2, SCA3; LKH-L1*), iar altele, cu transmitere autozomal recesivă (*PARK2, PARK6, PARK7, PARK9*). Gena *PARK1 (SNCA)* codifică alfa-sinucleina, o proteină din alcătuirea corpilor Lewy (agregate proteice compuse din peste 70 de proteine, unele implicate în patogeneza atât a formelor sporadice, cât și a celor familiale ale BP: alfa-sinucleină, parkină, sinfilină-1, ubiquitină, dorfina, proteina alfa B-cristalin).

> Mutațiile alfa-sinucleinei induc leziuni ale ADNmt și provoacă modificări dismorfice ale mitocondriilor

neuronale care vor elibera citocromul c, un activator al caspazei 9. La rândul ei, caspaza 9 va activa caspazele 3 şi 7, exacerbând apoptoza celulelor care conţin mutaţii ale alfa-sinucleinei. Mutaţiile genei *PARK8* (LRRK2--leucine-rich repeat kinase2) sunt întâlnite la aproximativ o treime dintre pacienţii cu forme familiale de BP, precum şi la 3% dintre cei cu forme sporadice. *PARK8* codifică dardarina, o kinază ale cărei forme mutante promovează autofosforilarea unor proteine ce urmau să fie degradate şi care, nemaifiind supuse destrucţiei, se vor acumula intensificând procesele morţii apoptotice.

Mecanismele prin care acţionează produşii mutanţi ai celorlalte gene identificate ca intervenind în etiopatogeneza BP (*parkina, DJ-1, PINK1*) sunt, încă, doar ipotetice. Incriminată a fost generarea radicalilor liberi care, în cantităţi excesive, produc leziuni celulare letale. Se consideră că proteinele mutante suprimă capacitatea celulelor de a neutraliza radicalii liberi, a căror acumulare se soldează cu moartea neuronilor dopaminergici.

Scleroza laterală amiotrofică (SLA) este consecinţa degenerării motoneuronilor somatici din cortexul motor, trunchiul cerebral şi măduva spinării. Înainte de a fi distruşi, neuronii motori dezvoltă incluzii proteinacee în pericarioni şi în axoni. Incluziile conţin ubiquitină şi una dintre proteinele asociate cu ALS: SOD1,TARDNA binding protein sau FUS/TLS (*fused in sarcoma/translated in liposarcoma*). Aproximativ 10% dintre bolnavi sunt purtători ai unor mutaţii autozomal dominante cu penetranţă înaltă, exprimate la vârsta maturităţii. Aproximativ 20% din cazurile familiale sunt consecinţa mutaţiilor care interesează gena nucleară codificatoare a uneia dintre formele superoxid dismutazei (SOD1). În lipsa SOD1, anionul superoxid – un radical liber generat în mitocondrii – rămâne activ perioade mai lungi de timp şi îşi exercită efectul toxic asupra ADNmt şi ADN nuclear, provocându-le leziuni ce se vor traduce prin deficit energetic. De menţionat că nu în toate cazurile familiale sunt detectate mutaţii ale SOD1, ceea ce atestă existenţa altor cauze genetice, încă neidentificate.

În **boala Alzheimer** (BA) mutaţiile ADNmt sunt detectabile în neuronii cortexului cerebral în care se înregistrează şi reduceri importante ale activităţii piruvat dehidrogenazei şi a complexului I. Aceste observaţii certifică participarea la patogenia bolii a perturbării mecanismelor mitocondriale generatoare de energie.

Cercetări recente au demonstrat că disrupţia proteinei mitocondriale Drp1, provocată de oxidul nitric, un radical liber răspunzător de reacţia de S-nitrozilare, mediază neurodegenerarea asociată cu BA. S-a stabilit că nitrozilarea proteinei Drp1 creşte rata fragmentării mitocondriale, ceea ce conduce la leziuni sinaptice şi la moartea neuronilor. Sursa oxidului nitric o reprezintă peptidul beta-amiloid (rezultat prin clivarea APP – Amyloid-Precursor-Protein) din alcătuirea plăcilor senile. Produs în exces, oxidul nitric inactivează enzima Drp1 (Dynamin-related protein), sporind astfel fragmentarea mitocondriilor şi, implicit, deteriorarea sinapselor. Identificarea proteinei Drp1 nitrozilate ca element răspunzător de alterarea sinapselor se constituie în premisă a dezvoltării medicamentelor care, blocând nitrozilarea Drp1, ar putea stopa sau încetini progresia BA.

Un alt ţesut ale cărui funcţii sunt frecvent alterate ca urmare a acumulării defectelor mitocondriale este miocardul. În fibrele musculare cardiace ale bolnavilor cu cardiomiopatie dilatativă analizele moleculare relevă prezenţa moleculelor ADNmt cu deleţii de dimensiuni variate. Majoritatea cazurilor de **cardiomiopatie dilatativă** sunt familiale. S-a sugerat că de producerea deleţiilor multiple ale ADNmt se face răspunzătoare mutaţia unei gene nucleare cu rol în menţinerea integrităţii genomului mitocondrial.

Diabetul zaharat insulino-independent (DZ tip 2) se dezvoltă la vârste avansate şi manifestă trăsăturile unei boli degenerative. La unii dintre bolnavii cu DZ tip 2 au fost detectate mutaţii ale ADNmt în celulele insulelor Langerhans şi în fibrele musculare scheletice. S-a demonstrat că agenţii diabetogeni – interleukina b, interferonul g, factorul de necroză tumorală tip alfa, aloxanul, streptozotocina – acţionează asupra mitocondriilor din celulele b insulare, stimulând producerea speciilor reactive de oxigen sau determinând alchilarea ADN. Rupturile induse prin aceste mecanisme în moleculele ADNmt antrenează moartea celulelor beta, urmată de instalarea insuficienţei de insulină.

La bolnavii cu sindrom Kearns-Sayre şi la cei cu oftalmoplegie externă cronică progresivă incidenţa diabetului zaharat este de câteva ori mai înaltă decât în populaţia generală, iar sindromul MELAS se asociază uneori cu DZ tip 2. Rezultă, aşadar, că celulele b insulare, mari consumatoare de energie, se situează printre elementele cele mai afectate de prezenţa mutaţiilor constitutive sau dobândite ale ADNmt.

3. Mutaţiile ADNmt şi tumorigeneza

Există un consens în a se considera că ADNmt este implicat în tumorigeneză, datorită vulnerabilităţii sale la stresul oxidativ, precum şi mutabilităţii înalte pe care o manifestă. Speciilor reactive de oxigen li se atribuie roluri în iniţierea şi promovarea cancerului, precum şi în reducerea producţiei de ATP mitocondrial. Aberaţii mitocondriale au fost notate în majoritatea tumorilor maligne (cancere de vezică urinară, sân, colon, rinichi, ficat, plămân, stomac, ale capului

şi gâtului, limfoame şi leucemii). Mutaţiile ADNmt detectate în cancere sunt similare celor răspunzătoare de producerea bolilor mitocondriale. Recent, s-a raportat prezenţa a 12 mutaţii somatice homoplasmice în şapte din zece linii celulare stabilite în tumori colorectale. De altfel, în cele mai multe cancere mutaţiile sunt homoplasmice, ceea ce sugerează că fixarea anumitor alterări ale ADNmt poate conferi celulele maligne un avantaj selectiv. Creşterea cantităţii de transcripte ale ADNmt, precum şi creşterea expresiei subunităţilor codificate de ADNmt din alcătuirea complexelor LR sunt interpretate ca reflectând răspunsul mitocondriilor la cerinţele înalte de energie ale celulelor canceroase. Este cunoscut că celulele maligne au, de regulă, o capacitate considerabil mai mare decât cea a corespondentelor lor normale de a realiza glicoliza aerobă, fapt ce justifică aserţiunea că o importanţă crucială în procesul tumorigenezei ar avea-o existenţa unei forme de interacţiune mitocondrie-celulă, încă neprecizată

4. Leziunile mitocondriale induse de medicamente

Există un consens în a se considera că disfuncţiile mitocondriale sunt drastic implicate în etiologia efectelor toxice ale medicamentelor. Mitocondriile pot fi lezate de medicamente atât direct – prin inhibarea transcripţiei complexelor LTE şi a enzimelor glicolizei şi beta-oxidării –, cât şi indirect – prin producerea radicalilor liberi, scăderea antioxidanţilor endogeni, depleţia nutrienţilor necesari pentru sinteza şi funcţionarea enzimelor mitocondriale şi a complexelor LTE. Lezarea mitocondriilor se face răspunzătoare de efectele adverse ale multor medicamente. Barbituricele au fost primele medicamente demonstrate a inhiba respiraţia mitocondrială prin blocarea activităţii NADH dehidrogenazei, situată la nivelul complexului I al LTE. Aspirina şi acidul valproic sechestrează coenzima A, tetraciclinele, antiinflamatoarele nonsteroidiene, acetaminofena, amineptina şi tianeptina inhibă enzimele beta-oxidării, amiodarona, perhexilina inhibă atât beta-oxidarea mitocondrială, cât şi OXPHOS. Alte substanţe blochează transcripţia ADNmt (interferonul alfa) sau replicarea ADNmt (didezoxinucleozidele). În cazurile severe, compromiterea producţiei de energie se poate solda cu insuficienţa hepatică, comă şi chiar moarte. În marea lor majoritate, medicamentele psihotrope deteriorează funcţia mitocondriilor. Dintre acestea pot fi menţionate: antidepresivele (amitriptilina, amoxapina, cipramil, prozac, sarafem, fontex); antipsihoticele (clorpromazina, haloperidol, risperidona, clozapina); anticonvulsivantele (acidul valproic, depaken, divaloproex); medicamentele administrate în demenţe (galantamina, tacrina); medicaţia bolii Parkinson (tolcapon, stalevo); benzodiazepinele (diazepam); medicaţia psihozelor bipolare (săruri de litiu).

Inhibitorii nucleozid revers transcriptazei – NRTI – (zidovudina, didanozina, zalcitabina, lamivudina) reduc capacitatea mitocondriilor de a genera energie, efectele adverse (polineuropatie, cardiomiopatie, steatoză, acidoză lactică, pancreatită, pancitopenie, disfuncţia tubilor contorţi proximali) fiind consecinţa reducerii activităţii ADN polimerazei-gamma şi a implicitei scăderi a cantităţii de ADNmt.

Rezultă din cele de mai sus că citopatiile mitocondriale induse de medicamente se fac răspunzătoare de multe dintre reacţiile adverse ale terapiei administrate. Se impune, aşadar, ca lansarea pe piaţă a unui medicament să fie condiţionată de testarea prealabilă a toxicităţii sale asupra mitocondriilor, pentru a proteja pacienţii de potenţialele efecte secundare, dar şi pentru a dezvolta strategii nutriţionale capabile să reducă riscurile iatrogene.

D. Sfatul genetic şi tratamentul bolilor mitocondriale

1. Sfatul genetic în citopatiile mitocondriale

Bolile mitocondriale pot fi consecinţa atât a unor mutaţii ale genelor nucleare, cât şi a mutaţiilor ADNmt. Alterările genelor nucleare se transmit fie după modul autozomal dominant, fie după cel autozomal recesiv, în timp ce transmiterea mutaţiilor mitocondriale este matriliniară. Deleţiile ADNmt sunt, de regulă, evenimente produse *de novo,* şi, ca atare, vor afecta un singur membru al familiei, riscul celorlalţi membri de a dezvolta boala fiind nesemnificativ. Mutaţiile punctiforme şi duplicaţiile mici ale ADNmt pot fi transmise pe linie maternă. În acest caz, este exclus ca tatăl probandului să fie afectat, însă mama ar putea fi purtătoare a mutaţiei, manifestă clinic sau asimptomatică. Un bărbat nu va transmite boala descendenţilor săi. Femeile purtătoare ale unei mutaţii heteroplasmice pot transmite descendenţilor o cantitate variabilă de ADNmt mutant, ceea ce va face ca în fratrie să existe o considerabilă variabilitate clinică.

Riscul părinţilor, fraţilor şi descendenţilor probandului de a dezvolta boala în cazul transmiterii

autozomal recesive sau autozomal dominante a afecțiunilor mitocondriale nu diferă de riscul transmiterii bolilor cauzate de mutații ale ADN nuclear.

Diagnosticul molecular prenatal comportă analiza celulelor fetale prelevate prin biopsia de vilozități coriale sau prin amniocenteză. Interpretarea rezultatelor în cazul mutațiilor mitocondriale se confruntă cu dificultăți majore deoarece procentul de ADNmt mutant din celulele trofoblastului sau din lichidul amniotic ar putea să nu corespundă cu cel din alte țesuturi fetale și, în plus, ar putea să se modifice în cursul dezvoltării, și oricând pe parcursul vieții. De aceea, diagnosticul prenatal nu este recomandat când mutațiile sunt heteroplasmice, excepție făcând mutațiile T8993G și T899C care sunt mai uniform distribuite în țesuturi, și a căror proporție se păstrează relativ constantă în timp.

2. Tratamentul bolilor mitocondriale

Tratamentele convenționale conduc uneori la ameliorarea temporară a simptomatologiei clinice a bolilor mitocondriale și la restaurarea, cel puțin parțială, a parametrilor biochimici alterați. Aceste tratamente comportă administrarea agenților antioxidanți (ascorbat, alfa-tocoferol, menadionă, glutation, acid lipoic, seleniu, mangan), a unor cofactori ai enzimelor lanțului respirator (riboflavina), a vitaminelor complexului B (tiamină, niacină, B6, B12, biotină, acid pantotenic), a L-carnitinei (o substanță alimentară necesară transportului acizilor grași prin membranele mitocondriale) și a coenzimei Q10, aceasta din urmă participând la generarea de energie și acționând ca antioxidant cu rol de protecție a celulelor împotriva injuriei produse de speciile reactive de oxigen.

Piruvatul de sodiu, administrat oral în doze de 0,5g/Kg/zi, a fost propus recent (2007) ca tratament potențial capabil să scadă rația lactat/piruvat, corelată cu diminuarea producției ATP prin glicoliză anaerobă, cel puțin la pacienții cu deficiență a citocrom c oxidazei. Tratamentul, a cărui durată a fost de un an, a ameliorat parametrii activității cardiace și a îmbunătățit capacitatea de efort a bolnavilor cu sindrom Leigh.

Trebuie specificat că tratamentele convenționale nu reușesc să stabilizeze boala și, cu atât mai puțin, să o vindece. La unii pacienți, sub acțiunea medicației administrate, severitatea simptomelor poate să decline, iar progresia bolii poate fi întârziată. De reținut, însă, că există remisiuni spontane temporare și, ca atare, eficiența terapiei este dificil de evaluat. Oricum, tratamentul se impune a fi condus de un specialist în boli metabolice deoarece administrarea fără prescripție a medicației se poate solda cu întârzierea sau eșecul stabilirii unui diagnostic corect.

Elaborarea unor strategii alternative reprezintă o cerință obligatorie; aceste strategii nu pot fi altele decât cele ale terapiei genice. Până în prezent au fost imaginate trei abordări diferite care vizează suplinirea sau corectarea prin metodele geneticii moleculare a defectelor structurale ale ADNmt:

- înlocuirea genelor mitocondriale mutante cu gene normale inserate în genomul nuclear. Procedura presupune convertirea prin mutageneză dirijată a codonilor eretici în cuvinte ale codului universal. Gena este apoi amplasată într-un vector și transfectată prin intermediul acestuia în genomul nuclear. Produsul proteic sintetizat în citoplasă este cuplat cu o secvență de sortare care îl introduce în mitocondrii unde va funcționa compensând deficitul creat de mutația patologică;
- introducerea în mitocondrii a unei proteine cuplate cu secvența de ADNmt care codifică lanțuri polipeptidice sau molecule de ARNt și ARNr. Importul în mitocondrii este asigurat prin atașarea semnalului de sortare. Prin această tehnică s-a reușit transferul în mitocondrii al unor segmente de ADN cu lungimi cuprinse între 0,3 și 3 Kb;
- eliminarea moleculelor ADNmt mutante prin blocarea specifică a replicării: se utilizează oligonucleotide antisens care, fixându-se pe secvența alterată, fac imposibilă replicarea moleculei în care se află mutația, fără a afecta replicarea moleculelor normale.

În laboratoarele de cercetare aceste strategii și-au dovedit eficiența. Introducerea lor în practică este însă condiționată de rezolvarea multiplelor probleme de ordin tehnic cu care se confruntă, în general, terapia genică.

Bibliografie specifică selectivă

1. Akst J. *Surprising mtDNA diversity*. Scientist 2010, martie.
2. Birch-Machin MA, Taylor RW, Cochran B *et al. Late-onset optic atrophy, ataxia and myopathy associated with a mutation of a complex II gene*. Ann Neurol 2000; 48:330-335.
3. Chen H, Chan DC. *Mitochondrial dynamics – fusion, fission, movement, and mitophagy – in neurodegenerative diseases*. Hum Mol Genet 2009; 18:169-176.
4. Chinnery PF, Turnbull DM. *The epidemiology and treatment of mitochondrial disease*. Am J Med Genet 2001; 106:94-101.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. Chinnery PF. *Mitochondrial Encephalomyopathies, Mitochondrial Myopathies, Oxidative Phosphorylation Disorders, Respiratory Chain Disorders*. 2006 p.f.chinnery@newcastle.ac.uk.
6. Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton SA. *S-Nitrosylation of Drp1 Mediates-Amyloid-Related Mitochondrial Fission and Neuronal Injury.* Science 2009; 324: 102-105.
7. Copeland WC. *Inherited Mitochondrial Diseases of DNA Replication.* Ann Rev Med 2008; 59:131-146.
8. Darin N, Oldfords A, Moslemi AR *et al. The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical and DNA abnormalities.* Ann Neurol 2001; 49:376-383.
9. DiMauro S, Schon EA. *Mitochondrial DNA mutations in human disease.* Am J Med Genet 2001; 106:18-27.
10. Elliot HR, Samuels DC, Eden JA *et al. Pathogenic Mitochondrial DNA mutations Are Common in the General Population.* Am J Hum Genet 2008; 83:254-260.
11. Gastaldi G, Giacobino JP, Ruiz J. *Syndrome métabolique, une maladie mitochondriale?* Rev Med Suisse 2008; 160:139-148.
12. Hazkani-Covo E, Ueller RM, Marin W. *Molecular poltergeists: Mitochondrial DNA copies (numts) in sequenced nuclear genomes.* Plos Genet 2010; 6:e1000834, doi:10.1371.
13. Henchcliffe C, Beal MF. *Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis.* Nature Clin Practice Neurology 2008; 4:600-609.
14. Johns DR. *Mitochondrial DNA and disease.* N Engl J Med 1995; 333:638-644.
15. Leonard JV, Schapira AVH. *Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects.* Lancet 2000; 355:299-304.
16. Liesa M, Palacin M, Zorzane A. *Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease.* Physiol Rev 2008; 89:799-845.
17. Poulton J, Chiaratti MR, Meireless FV *et al. Transmission of mitochondrial DNA disease and ways to prevent them.* Plos Genet 2010; 6:e100166, doi:10.1371.
18. Mc Farland R, Taylor RW, Douglas MT. *A neurological perspective on mitochondrial disease.* Lancet Neurology 2010; 9:829-840.
19. Munnich A, Rustin P. *Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders.* Am J Med Gen 2001; 106:4-17.
20. Ramalgan N. *Mitochondrial Diseases: the Cracked Bottleneck of Inheritance.* J Young Investigators 2010; 20, 2:111.
21. Ştefănescu DT, Călin GA, Ştefănescu F. *Genetică Medicală – Progrese Recente*. Editura Tehnică, Bucureşti, 1998.
22. Samudio I, Fiegi M, Andreeff M. *Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism.* Cancer Res 2009; 69:2163-2166.
23. Suomalainen A, Kaukonen J, Amati P *et al. An autosomal locus predisposing to deletions of mitochondrial DNA.* Nat Genet 1995; 9:146-151.
24. Yz-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF. *Inherited mitochondrial optic neuropathies.* J Med Genet 2008; 46:145-158.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 14

BOLILE MULTIFACTORIALE

Mulţi medici consideră că domeniul geneticii clinice este rezervat specialiştilor care se ocupă de boli rare, monogenice sau cromozomiale. Această concepţie este însă profund greşită şi tinde să se schimbe rapid, deoarece, de exemplu, în anul 2000, în nouă din primele zece cauze de mortalitate, printre care bolile cardiace şi cancerul, au fost identificate componente genetice importante. Toate aceste afecţiuni sunt considerate astăzi ca fiind boli multifactoriale.

Bolile multifactoriale sunt determinate de interacţiunea dintre factorii genetici şi diferiţi factori din mediu care declanşează, accelerează sau exacerbează procesul patologic. Deci ereditatea lor este *complexă, multifactorială*. Aceste afecţiuni sunt *boli comune* (frecvente), interesând mai mult de 5% din populaţie, şi determină o proporţie importantă din morbiditatea şi mortalitatea generale.

Bolile multifactoriale cuprind două mari categorii de afecţiuni: *bolile comune ale adultului* (boala coronariană, hipertensiunea arterială, diabetul zaharat, astmul bronşic, ulcerul peptic, schizofrenia, obezitatea, cancerul ş.a.) – cu o prevalenţă de 1-5% – şi *malformaţiile congenitale izolate* la copil (defectele de tub neural, despicăturile labiale şi/sau palatine, malformaţiile congenitale de cord, stenoza pilorică, piciorul strâmb congenital, luxaţia congenitală de şold ş.a.) – cu o incidenţă de 1-8‰ de nou-născuţi.

Precizăm că unele dintre aceste entităţi au etiologie heterogenă şi pot include şi forme monogenice cu transmitere mendeliană, mai mult sau mai puţin rare. Astfel, circa 5% dintre cazurile de boală coronariană sunt produse de hipercolesterolemia familială (boală monogenică autozomal dominantă), iar circa 5% dintre cazurile de cancer de sân apar la femei purtătoare ale unor mutaţii germinale ale genelor *BRCA1* sau *BRCA2* (transmise autozomal dominant). Deci *un set de bolnavi cu boli comune vor avea un determinism monogenic şi riscuri de recurenţă mult mai mari decât cele calculate empiric*. Acest lucru este foarte important de reţinut pentru practica sfatului genetic.

Contribuţia factorilor genetici în producerea acestor boli a fost demonstrată de agregarea familială, de studiile efectuate pe gemeni, de studiile de adopţie sau de asocierea cu anumiţi markeri genetici (vezi capitolul 6.E.1). Mai mult, această contribuţie a fost şi cuantificată prin determinarea *heritabilităţii*, ce exprimă proporţia factorilor genetici, *cota* de participare a eredităţii, în etiologia bolii (vezi tabelul 6.15). Şi totuşi, nu se cunosc încă numărul genelor implicate în producerea bolii, natura lor şi mai ales modul în care un anumit genotip – prin combinaţie cu anumiţi factori de risc din mediu – determină boala. Se consideră că factorii genetici determină o **predispoziţie genetică** la boală, care va duce la îmbolnăvire numai dacă asupra individului vulnerabil acţionează anumiţi factori nocivi din mediu. S-au elaborat diferite modele teoretice explicative (de exemplu, modelul susceptibilităţii cu prag sau modelul mixt, oligogenic – descrise în secţiunea 6.E.2.2), precum şi reguli privind calcularea riscului empiric de recurenţă în familie (vezi capitolul 10.C.5).

A. Identificarea genelor implicate în bolile multifactoriale.

Aplicarea unor tehnici de analiză moleculară a *polimorfismelor genice* combinate cu noi strategii de *epidemiologie genetică* va permite, foarte probabil, identificarea genelor sau mai exact a variantelor alelice implicate în bolile multifactoriale, înţelegerea etiopatogeniei lor, evaluarea corectă a riscului şi mai ales stabilirea unor mijloace adecvate de prevenţie.

Reamintim că o genă poate prezenta mai multe variante alelice care, atunci când depăşesc o frecvenţă populaţională de 1%, realizează un **polimorfism genic**. Studiul polimorfismelor este important, deoarece *anumite alele se corelează cu un risc crescut* pentru o anumită boală (vezi capitolul 6.D). Dintre polimorfismele genetice, aproximativ 90% sunt

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

reprezentate de polimorfismele mononucleotidice – **SNPs** (de la *single nucleotide polymorphism*; se pronunță „snips") – ce au o distribuție de circa 1 per 1.000 pb fiind localizate inclusiv în regiunile codante (exoni) și reglatoare; de aceea, se crede că ele pot fi implicate în procesul de boală. În felul acesta, SNPs reprezintă o nouă generație de markeri genetici utili pentru identificarea locilor asociați cu boli comune ale adultului, precum și cu răspunsul la medicamente.

1. Etapele de identificare a genelor de susceptibilitate

Procesul de identificare și localizare a genelor de susceptibilitate implicate în etiologia bolilor comune se poate realiza în patru etape majore de lucru.

(1) Studiile de înlănțuire și de asociere

Aceste studii au ca scop stabilirea unei asocieri semnificative a unei anumite regiuni genomice sau variante alelice cu caracterul complex respectiv, pe baza *ipotezei boală comună – variantă comună* care pornește de la premisa că principalele alele de susceptibilitate vor putea fi identificate la toți bolnavii cu aceeași afecțiune.

Analizele de înlănțuire se efectuează de obicei prin metoda perechilor de frați bolnavi care au o alelă în comun, moștenită de la părinții lor. În această metodă (numită și *analiză de înlănțuire nonparametrică sau liberă*) nu se ține seama de numărul de loci și nici de un anumit model de transmitere (AD, AR, LX) ci numai pe prezumția că frații afectați vor avea mai probabil alele în comun decât ar fi de așteptat numai prin întâmplare. Dacă o regiune genomică sau alelă este prezentă mai frecvent decât era de așteptat la frații concordanți pentru boală comparativ cu cei neafectați atunci se poate presupune că alelele unui locus sau ale mai multor loci din regiune predispun la boală deci sunt implicate în patogenia bolii.

Studiile de asociere compară incidența unui anumit *polimorfism* la bolnavi (de exemplu, haplotipurile HLA) cu incidența lui într-un grup control; dacă o alelă specifică a locusului polimorfic are o prezență semnificativ mai mare la indivizii cu boală comparativ cu cei neafectați, atunci se poate presupune că alela respectivă este implicată în patogenia bolii.

Studiile de asociere sunt din ce în ce mai frecvente datorită progreselor înregistrate în secvențierea genomului uman și în identificarea polimorfismelor ADN, în special SNPs. Au apărut astfel (2005) *studiile de asociere utilizând întregul genom* („*genome wide association studies*" – **GWAS**) în care se recurge la scanarea întregului genom (cu ajutorul a sute de mii de markeri ADN polimorfici, de tipul SNPs) în scopul identificării regiunilor genomice comune prezente la membrii familiei ce prezintă boala (vom reveni în secțiunea următoare). Aceasta permite prezumția că în regiunea sau regiunile respective se află un locus implicat în boală. Identificarea variantei alelice cauzale (care de regulă este diferită de markerul SNP identificat inițial) și determinarea mecanismului prin care această variantă participă la realizarea bolii necesită, evident, alte studii ulterioare.

(2) Cartografierea de finețe

Această etapă are ca scop reducerea la maximum posibil a dimensiunii intervalului critic în care se găsește gena și se realizează prin studii familiale în care există un dezechilibru al înlănțuirii sau prin studii caz-control. Asemenea studii permit reducerea intervalului critic la dimensiuni de ordinul a 1 cM.

(3) Analiza secvenței

Analiza secvenței ADN în intervalul minim este necesară pentru identificarea variantelor nucleotidice prezente. În ciuda eforturilor, intervalul minim poate conține frecvent câteva gene, fiecare cu numeroase variante nucleotidice, unele la nivelul regiunilor codante, iar altele în regiunile care le flanchează. Dacă, în cazul regiunilor codante, efectele pot fi ușor prevăzute prin simpla corelație cu codul genetic, consecințele unor modificări în regiunile necodante sunt mult mai dificil de interpretat. Se consideră că adeseori caracterele multifactoriale pot fi determinate mai degrabă de variante ale unor secvențe reglatorii decât de variante în secvențele codante.

(4) Teste funcționale ale genelor candidate

Această etapă constă în demonstrarea, pe cale experimentală, a efectului funcțional al variantelor candidat identificate. Aceasta presupune utilizarea unor modele celulare sau animale și analizează efectul pe care îl are introducerea în genomul celulelor sau al organismelor model, prin tehnica de inginerie genetică numită *knock-in*, a genei testate. De multe ori însă rezultatele obținute pe un model celular sunt dificil de extrapolat la un organism întreg, la fel cum este dificilă extrapolarea rezultatelor de la o specie la alta.

În ciuda dificultăților menționate au fost identificate câteva variante genice implicate în etiologia unor caractere multifactoriale la om. Mai jos sunt descrise câteva dintre cele mai sugestive exemple.

- Astfel, înlănțuirea genetică a **diabetului zaharat tip 1** cu genele complexului major de histocompatibilitate *HLA-DR* și *HLA-DQ* a fost stabilită de peste 20 de ani. Există mai multe categorii de dovezi care suportă ferm rolul *alelei DQ-beta* în susceptibilitatea la DZ tip 1. În **diabetul zaharat tip 2** un *screening* la nivelul

întregului genom a permis identificarea unei regiuni de pe cromozomul 2, puternic înlănțuită cu boala. Regiunea a putut fi redusă, din fericire, la circa 1,7 Mb. În interiorul acestei regiuni au fost identificate multiple polimorfisme mononucleotidice (SNP), iar dintre acestea, haplotipul unei grupări de trei SNP, de la nivelul genei pentru *calpaina-10* (*CAPN10*), s-a dovedit a fi puternic asociat cu DZ tip 2, în mai multe populații.

- Alela E4 a *apolipoproteinei E* (*APOE4*) este asociată într-o manieră dependentă de doză cu susceptibilitatea la **boala Alzheimer**. Această asociere, împreună cu localizarea proteinei APOE4 la nivelul leziunilor cerebrale și cu rolul proteinei ApoE (de la șoarece) în formarea depozitelor de amiloid susțin cu putere rolul genei *APOE4* în susceptibilitatea la boala Alzheimer.
- Gena *CARD15* (care codifică proteina 15 cu domeniu de recrutare a caspazei), localizată la nivelul cromozomului 16, a fost identificată ca genă de susceptibilitate la **boala Crohn**.
- Alte gene implicate în etiologia unor caractere multifactoriale, pentru care există dovezi puternice, sunt *ADAM33* (cromozomul 20, codifică o proteină din familia dezintegrinelor și metaloproteazelor) în **astmul bronșic** sau *ACE1* (cromozomul 17, codifică enzima de conversie a angiotensinei 1) în susceptibilitatea la **hipertensiunea arterială esențială**.

2. Studiile de asociere utilizând întregul genom

Studiile de asociere utilizând întregul genom (GWAS) sunt studii bazate pe ipoteza că variantele alelice ce determină susceptibilitatea la o boală comună se asociază mai frecvent decât ne așteptăm (se află în *dezechilibru de înlănțuire genetică*) cu anumiți markeri genetici ce definesc o anumită regiune genomică (haplotip). Identificarea haplotipului asociat bolii permite definirea regiunii în care este localizată varianta cauzală.

Realizarea acestui tip de studii a devenit posibilă datorită a două performanțe deosebite: (1) identificarea unui număr foarte mare de markeri de tip SNP prin progresele înregistrate de tehnicile de secvențiere; (2) genotiparea prin tehnicile cu debit mare, de tipul hibridării pe microrețele ADN de tip SNP, care printr-o singură „scanare" a ADN-ului unei persoane, testează circa un milion de SNPs.

În ultimii ani proiecte internaționale de cercetare axate pe identificarea de markeri polimorfici în genomul uman, cum sunt proiectele **„HapMap"** și **„1000 Genomes"**, au permis identificarea a peste 18 milioane de SNP și caracterizarea *blocurilor de înlănțuire genetică* (formate din mai multe SNPs) sau **haplotipuri** (determinând mărimea lor și polimorfismele SNP care le definesc) la mai mulți indivizi aparținând unor populații diferite.

Pentru a înțelege modul de realizare a acestor studii să examinăm situația ipotetică a unei populații în care, la un moment dat, pentru o pereche de cromozomi omologi, există doar două posibilități, fiecare cromozom purtând alele SNP diferite de cele prezente pe celălalt cromozom. În cursul meiozelor, prin *crossing-over*, cromozomii vor schimba regiuni de mărime variabilă și își vor amesteca markerii astfel încât, după un număr de generații, cromozomii vor avea un aspect „în mozaic". Mărimea fragmentelor care formează acest mozaic este dependentă de numărul de generații în decursul cărora au fost realizate recombinări: cu cât numărul de generații este mai mare, cu atât numărul de puncte de „rupere" ale celor doi cromozomi inițiali este mai mare și deci mărimea fragmentelor mai mică. Deși se consideră că punctele de realizare ale recombinărilor sunt aleatorii, rezultatele analizelor au demonstrat că există regiuni genomice care favorizează recombinările numite „puncte fierbinți de recombinare". Aceste puncte pot fi deci „reutilizate" astfel încât recombinările repetate vor determina formarea de *regiuni care se transmit în bloc* și în interiorul cărora probabilitatea de recombinare este mică, regiuni numite haplotipuri.

În interiorul fiecărui haplotip majoritatea markerilor vor avea o origine comună (unul din cei doi cromozomi „originali"), cu excepția, bineînțeles, a variațiilor ce au apărut prin mutații în cursul generațiilor și care sunt comune unei părți variabile din populație, în funcție de vechimea mutației. Anumiți markeri de tip SNP sunt *reprezentativi* pentru aceste blocuri haplotipice și sunt numiți **„tag SNPs"** (*„SNPs etichetă"*); ei au o frecvență populațională de cel puțin 5% și sunt folosiți în studiile de asociere utilizând întregul genom (GWAS). Aceşti markeri, deși au dezavantajul de a fi mai puțin informativi decât microsateliții deoarece sunt doar bialelici, sunt extrem de numeroși și ușor de genotipat prin tehnicile de „scanare genomică" cu debit mare.

Genotiparea concomitentă a unui număr extrem de mare de markeri SNP la mii de pacienți și indivizi sănătoși a permis identificarea regiunilor genomice/haplotipurilor care sunt prezente la pacienții cu o anumită boală comună. Aceste haplotipuri sunt în dezechilibru de înlănțuire cu varianta alelică ce participă la realizarea fenotipului studiat, deci în regiunea sau regiunile respective se află un locus implicat în boală. Studii ulterioare sunt necesare pentru a confirma această asociere, a identifica varianta cauzală (care de regulă este diferită de markerul SNP identificat inițial) și a determina mecanismul prin care această variantă participă la realizarea bolii.

Studiile de asociere utilizând întregul genom sunt de mai multe tipuri, fiecare având avantaje și dezavantaje (tabelul 14.1):

- studiile de tip *„caz-control"* (cele mai utilizate în GWAS): frecvența alelelor de la pacienții afectați

Tabelul 14.1. Avantajele şi dezavantajele diferitelor studii GWAS

	Caz-control	Cohortă	Trio
Avantaje	Durata relativ redusă Număr mare de participanţi Optim pentru a studia boli rare	Cazurile sunt „incidente" Măsurarea directă a riscului	Nu necesită fenotiparea la părinţi Nu sunt influenţate de stratificarea populaţională
Dezavantaje	Erori ce pot rezulta din stratificarea populaţională Necuantificarea cazurilor de boală fatală sau ale celor de boală silenţioasă Supraestimarea riscului relativ pentru bolile multifactoriale	Urmărire îndelungată a cazurilor Costuri ridicate Nepotrivite pentru studiul bolilor rare	Dificil de realizat, în special în cazul bolilor cu debut în perioada de adult Foarte sensibile la erorile de genotipare

de boală este comparată cu frecvenţa alelelor la indivizii din grupul control;

- studiile de tip „*cohortă*" care constau în colectarea de informaţii de la un număr mare de indivizi care apoi sunt ţinuţi sub observaţie pentru a evalua incidenţa apariţiei bolii la subgrupuri definite prin „variante" genetice diferite.
- studiile de tip „trio": includ pacientul afectat de boală precum şi ambii părinţi ai acestuia.

GWAS[1] au revoluţionat cercetarea factorilor genetici asociaţi cu bolile complexe deoarece reprezintă un progres important comparativ cu studiile „*genelor candidat*" (loturi mici, număr limitat de variante alelice) sau studiile de înlănţuire bazate pe familii (putere de rezoluţie mică). GWAS pot da informaţii importante privind „arhitectura alelică" (număr, tip, mărimea efectului şi frecvenţa variantelor de susceptibilitate) a bolilor complexe.

Prin GWAS (peste 600) s-au identificat, în ultimii cinci ani, asocieri semnificative a circa 800 de SNPs ce implică sute de loci în numeroase boli multifactoriale (peste 150). Aceste asocieri sunt concordante cu *ipoteza boală comună-variantă comună*, potrivit căreia influenţele genetice asupra susceptibilităţii la boli comune sunt atribuite unui număr limitat de variante prezente la mai mult de 1-5% din populaţie. Printre primele succese ale acestei tehnici se numără identificarea unor gene asociate cu degenerescenţa maculară (*CFH*), boala coronariană (*CDKN2A/2B*), poliartrita reumatoidă (*TRAF1–C5*), diabetul zaharat (*TCF7L2; SLC30A8; CDKAL1*), astmul bronşic (*ORMDL3; GSDML*), obezitatea (*INSIG2*, *FTO*) etc.

Paradoxal, cu toate rezultatele obţinute, progresele făcute în descifrarea rolului factorilor genetici în caracterele complexe normale şi bolile multifactoriale sunt încă modeste.

- Variantele identificate explică numai o mică parte din heritabilitatea caracterelor complexe studiate (de exemplu, 40 de loci au fost asociaţi cu greutatea corpului, în care heritabilitatea a fost apreciată la 80%, dar ei nu explică decât 5% din variaţia fenotipică). Cele mai multe din variantele identificate până acum conferă o creştere relativ mică a riscului de boală şi explică numai o mică parte a agregării familiale a BMF. Au fost formulate mai multe explicaţii ale „*heritabilităţii lipsă*":
  - nu au fost „capturate" variante structurale genomice (CNVs sau indels) sau variante rare (cu o frecvenţă populaţională sub 1%) cu un efect posibil mai important; de exemplu, 11 din 30 de gene care au variante comune asociate cu nivelul lipidic au şi alele rare cu efecte fenotipice mari în dislipidemii mendeliene, sugerând că genele ce au variante comune cu efecte modeste pot conţine şi variante rare cu efecte mai mari;
  - nu se pot identifica interacţiuni între gene sau între gene şi mediu;
- Puţine dintre SNPs identificate (uneori prin studii „replicate" care au confirmat asocierea) au implicaţii funcţionale clare şi relevante pentru mecanismul bolii;
  - numai 15% din SNPs asociate cu boli comune se găsesc în regiuni codante ale genelor, putând altera structura sau funcţia unor proteine; 40% se găsesc în introni, iar alte 45% în regiuni reglatoare sau regiuni intergenice (uneori în aşa numitele deşerturi genice); modul în care SNPs în regiunile necodante influenţează expresia genică şi fenotipul boală rămâne a fi elucidat (localizarea lor ar putea coincide cu existenţa unor elemente reglatoare: activatori, insulatori, situsuri de fixare a unor factori de transcripţie sau secvenţe codante pentru microARN;
  - s-au identificat asocieri între SNPs şi gene care nu erau considerate a avea un rol într-o boală

1. Toate studiile GWAS publicate după 2005 sunt incluse într-un catalog on line: www.genome.goc.gwastudies.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

dată (de exemplu gena *CFH* ce intervine în inflamația mediată de complement în degenerescența maculară legată de vârstă);
  - s-au identificat asocieri cu anumite gene în boli considerate neînrudite (de exemplu, gena *CDKN2A* în boala coronariană, DZ tip 2 și melanom).
- SNPs „etichetă" identifică de fapt o anumite regiune genomică (un bloc haplotipic) asociată cu o boală; probabil testând toate SNPs din această regiune s-ar putea identifica variante cauzale; această abordare încă puțin folosită, pare promițătoare după ce folosind-o s-a stabilit rolul genei *IFIH1* – cu rol în răspunsul antiviral – în determinarea susceptibilității la DZ tip 1 prin infecții virale.
- Nu știm încă cum să folosim datele obținute în clinică pentru predicția bolii sau pentru alegerea unui medicament sau a unei doze utile.
- În afara celor câteva milioane de SNPs există în genomul uman și alte variante structurale „non-SNP" frecvente care ar putea avea un rol în susceptibilitatea și/sau patogenia bolilor comune. Astfel, au fost descrise recent câteva sute de mii de indels scurte (3-16 nucleotide) sau mii de CNV (vezi Proiectul „1000 Genomes")

Arhitectura genetică a bolilor complexe rămâne încă evazivă: nu este clar câte și care variante genetice contribuie la riscul genetic și nici care este proporția dintre variantele cauzale frecvente și rare. Nu se știe dacă GWAS vor fi capabile să identifice toate variantele genetice din bolile complexe. Perfecționarea microrețelelor genomice va aduce cu certitudine noi informații, iar posibilitățile de a secvența întregul genom la prețuri rezonabile vor rezolva problemele actuale. Rezultatele obținute până în acest moment sunt promițătoare, dar ne aflăm încă departe de a le putea utiliza direct în practica clinică. Rolul pe care aceste studii de asociere genomică îl va îndeplini în viitorul apropiat va fi cel mai probabil unul de descifrare a mecanismelor moleculare de producere a bolilor și nu unul de evaluare „comercială" a riscului de boală. Cert este că studiile GWAS „pavează" calea lungă a introducerii medicinii personalizate, predictive și preventive (vezi capitolul 9.D).

B. Bolile comune ale adultului

1. Boala coronariană

Boala coronariană reprezintă una dintre principalele cauze de morbiditate (3%) și mortalitate din țările dezvoltate, fiind expresia leziunilor aterosclerotice de la nivelul arterelor coronare.

Aceste leziuni încep să se producă foarte precoce în cursul vieții, prin acumularea de lipoproteine în intima arterelor coronare, și evoluează formând o placă de aterom ce conține țesut fibros, fibre musculare netede și lipide. Aceasta îngustează lumenul arterelor coronare, reducând fluxul sangvin. Uneori, placa de aterom se poate rupe, producând obstrucția vasului (de exemplu, infarct miocardic acut).

Riscul de producere a bolii coronariene este crescut de către o serie de *factori de mediu*: grăsimile din alimentație, fumatul, consumul de alcool și inactivitatea, precum și de o serie de boli ca hipertensiunea, diabetul zaharat, hiperlipidemiile. Numeroase studii, efectuate în ultimele 3-4 decenii, au arătat însă că *factorii genetici* au o contribuție importantă în etiologia bolii. Astfel, agregarea familială este crescută, iar concordanța bolii la gemenii monozigoți (MZ) este semnificativ mai mare decât la gemenii dizigoți (DZ). Rudele de gradul I ale bolnavilor au un risc de 5-7 ori mai mare de a face boală coronariană[2] comparativ cu populația generală.

Un element care pledează pentru ereditatea multifactorială a bolii coronariene îl reprezintă faptul că bărbații sunt mai frecvent afectați și fac forme mai grave (decesele prin infarct miocardic acut sunt mai frecvente); rudele de gradul I ale unei femei bolnave (sexul mai rar afectat) au un risc mai mare de boală coronariană comparativ cu rudele bărbaților bolnavi.

Pornind de la aceste constatări s-au cercetat genele[3] și produșii lor proteici care ar putea influența dezvoltarea și progresia aterosclerozei coronariene. În această categorie se includ gene ce codifică proteine implicate în transportul și *metabolismul lipidelor*[4], *sistemul renină-angiotensină, citokinele și moleculele de adeziune, sistemul de coagulare și fibrinoliză* și, mai recent, genele implicate în producerea *oxidului nitric*, în metabolismul *homocisteinei* și în inflamație (tabelul 14.2). Deși rolul multor polimorfisme nu a fost încă unanim confirmat, genele implicate în metabolismul lipidelor, cum ar fi *apolipoproteina E* (*APOE*)

2. Riscul este și mai mare dacă boala apare la o vârstă mai tânără, înainte de 55 de ani la bărbat și 65 de ani la femeie.
3. Se estimează că peste 250 de gene intervin în patogenia bolii coronariene.
4. În boala coronariană se întâlnește de obicei un nivel crescut al LDL-colesterolului, ApoB (fracția majoră a LDL), Lp(a) și un nivel scăzut al HDL.

Tabelul 14.2. Principalele gene implicate în boala coronariană

Genă	Localizare cromozomială	Efecte
LDLR (receptorul pentru LDL)	19p32	Gena codifică o proteină receptor care îndepărtează LDL din sânge; s-au descris peste 350 de mutații, responsabile de *hipercolesterolemia familială*. Circa o persoană la 500 are o mutație a acestei gene care duce la funcționarea deficitară a proteinei; LDL nu este îndepărtat eficient din circulație, concentrația sa plasmatică crește și se produce boală coronariană la o vârstă tânără
APOA1 (apolipoproteina A1)	11q23	Gena codifică APOA1 – o proteină care este legată de colesterol în HDL. Unele variante ale genei produc niveluri scăzute de APOA1. Rezultă o scădere a nivelului plasmatic de HDL și secundar, boală coronariană precoce.
APOB (apolipoproteina B)	2p24	Gena codifică APOB – o proteină care este legată de colesterol în LDL. Unele mutații ale genei produc niveluri crescute de LDL-C, și secundar boală coronariană precoce.
APOE (apolipoproteina E)	19q13.2	Gena codifică o proteină care este implicată în îndepărtarea LDL din sânge. Unele variante (în special E4) duc la niveluri crescute de LDL, în special dacă alimentația este bogată în colesterol.
LPA apolipoproteina(a)	6q27	Gena codifică o proteină care se combină cu colesterolul și formează particule numite „Lp(a)". Anumite alele se asociază cu niveluri crescute de Lp(a) și cresc riscul de producere a bolii coronariene.
CETP (proteina de transfer a esterilor de colesterol)	16q21	Gena codifică o proteină care ajută la degradarea HDL. Anumite variante ale genei se asociază cu o degradare mai puțin eficientă a HDL și nivelul său plasmatic crește, dar nu este cert că purtătorii acestor variante sunt protejați de boală coronariană.
ITGB3 (integrina beta 3)	17g21	Gena codifică o proteină localizată pe suprafața plachetelor care au un rol critic în coagulare. Unele variante ale genei sunt prezente la jumătate din pacienții sub 60 de ani ce fac boală coronariană.
ELN (elastina)	7q11.2	Gena codifică elastina, o componentă a fibrelor elastice din structura arterelor. Deficitul în elastină se asociază cu îngroșarea pereților arteriali și îngustarea lumenului, fenomene ce favorizează ateroscleroza. Pierderea de elastină se produce odată cu înaintarea în vârstă dar nu se știe încă dacă acest proces se corelează cu dezvoltarea bolii coronariene.
PTGIS (prostaglandina I2 sintetaza)	20q13.11	Gena codifică o proteină, prostaciclina, care împiedica adeziunea unor componente chimice ale sângelui la pereții arteriali.
ACE (enzima de conversie a angiotensinei)	17q23	Gena codifică angiotensina, o proteină ce acționează asupra rinichilor, miocardului și pereților arteriali. Anumite variante ale genei au fost corelate cu un risc crescut de boală coronariană, dar rezultatele investigațiilor nu sunt încă foarte clare.
MTHFD1L (enzima metilen-tetrahidrofolat sintetaza)	6q25.1	Gena codifică isoenzima mitocondrială THF (D1 – enzima tetrahidrofolat sintetaza) care influențează nivelul plasmatic de homocisteină, ce ar putea fi un factor de risc crescut pentru boala coronariană.
CDKN2A, CDKN2B (inhibitori ai kinazelor ciclin-dependente)	9p21.3[5]	Genele codifică inhibitori ai kinazelor ciclin-dependente care joaca un rol important in reglarea ciclului celular si ar putea fi implicate, prin intermediul TGF-β, in mecanismele etiopatogenice ale aterosclerozei.
ADAMTS7 (protează Zn-dependentă)	15q24.2	Gena codifică o proteină cu activitate de dezintegrină și metaloprotează și are domenii asemănătoare structural cu cele ale trombospondinei. Mecanismul implicării sale în riscul la boala coronariană nu este cunoscut în prezent.
PDGFD (factor de creștere)	11q22.3	Gena codifică un factor de creștere derivat din plachete care are rol important în controlul activităților macrofagelor.
LIPA (lipază)	10q23.31	Gena codifică o lipază lizozomală acidă care are rol important în controlul sintezei intracelulare a colesterolului.

5. Această regiune cromozomială, a fost asociată de asemenea și cu o susceptibilitate crescută pentru apariția diabetului zaharat de tip 2, sugerând posibilitatea existenței unui mecanism complex ce ar putea sta la baza apariției atât a bolii coronariene, cât și a diabetului zaharat.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sau unele variante ale genei pentru receptorul LDL, au un rol cauzal atât asupra nivelului plasmatic al LDL-colesterolului, cât şi asupra fenotipului clinic al bolii coronariene. De asemenea, varianta B2/B2 a genei pentru *proteina de transfer a esterilor de colesterol* (*CETP*) se asociază cu un nivel crescut al HDL-C care protejează persoana de boala coronariană. S-a mai stabilit că indivizii cu alela D (genotip DD sau DI) a genei pentru *enzima de conversie a angiotensinei* (*ACE*) au o activitate ACE mai mare şi un prognostic mai pesimist. Au fost evidenţiate şi o serie de polimorfisme genetice care ar putea avea efect protectiv împotriva dezvoltării bolii coronariene, precum alelele mai rare ale polimorfismelor *T715P* la nivelul *selectinei P* sau *V34L* la nivelul *factorului XIII* al coagulării (alela cu prolină în cazul selectinei P şi alela cu leucină în cazul factorului XIII al coagulării asociază o reducere a riscului de dezvoltare a infarctului miocardic acut).

Recent, studiile de asociere la nivelul întregului genom au evidenţiat o variantă alelică comună situată în regiunea cromozomială 9p21.3 implicată în creşterea susceptibilităţii la boală coronariană; această mică regiune este lipsită de gene ce codifică proteine, în schimb conţine o genă pentru un ARN necodant antisens (locus *INK* sau *ANRIL*), implicat în reglarea transcripţiei altor gene, foarte probabil a genelor *CDKN2A* şi *CDKN2B* situate la circa 100 kb. Aceste gene codifică inhibitori ai kinazelor dependente de cicline care joacă un rol important în reglarea ciclului celular şi ar putea fi implicate, prin intermediul TGF-β, în patogenia aterosclerozei precoce.

O atenţie particulară s-a acordat *interacţiunilor* dintre factorii de mediu şi gene în producerea bolii coronariene. Astfel, s-a evidenţiat o interacţiune semnificativă între fumat (care, prin produşii de combustie, alterează endoteliul vascular favorizând ateroscleroza şi tromboza) şi polimorfismul genelor *APOE şi lipoprotein lipazei*: persoanele cu alela E4 a genei[6] pentru apolipoproteina E sau cu alela D9N a genei pentru lipoprotein lipază sunt foarte vulnerabile la efectele adverse ale fumatului şi prezintă un risc foarte mare pentru boala coronariană. Aceeaşi corelaţie a fost identificată între aceste alele şi activitatea fizică (care scade concentraţia plasmatică de lipoproteine). De asemenea, s-a stabilit că persoanele cu anumite genotipuri (*E2/E3* pentru gena *APOE* sau *B2/B2* pentru gena *CETP*) nu răspund la modificările dietei (reducerea grăsimilor).

Nivelul sangvin ridicat al *homocisteinei* este un factor de risc pentru boala coronariană. Cea mai frecventă cauză a hiperhomocisteinemiei este *polimorfismul enzimei metilen-tetrahidrofolat-reductaza* (*MTHFR*) (OMIM 236250). O alelă ce codifică o enzimă termolabilă, asociată cu *ingestia alimentară redusă de acid folic*, poate produce creşterea nivelului homocisteinei şi riscul pentru boală coronariană. Mai multe studii au arătat că 17-28% dintre bolnavii coronarieni sunt homozigoţi pentru gena ce codifică această variantă enzimatică. Ţinând cont de frecvenţa bolii coronariene, devine evident că suplimentarea alimentară cu acid folic (prezent în făină şi produse de cereale) ar putea contribui la scăderea nivelului homocisteinei.

În sfârşit, trebuie să subliniem faptul că unii factori genetici influenţează şi *răspunsul individual la tratament*. Astfel, răspunsul pacienţilor la tratamentul cu statine este mai mare la indivizii ce au genotipuri *APOE* şi *CETP*, asociate cu un prognostic mai defavorabil (alela *E4 APO* şi alela *B1 CETP*). Bolnavii coronarieni cu genotipul D/D al genei *ACE* beneficiază mai mult de pe urma tratamentului cu beta-blocante decât indivizii cu genotipurile I/I sau I/D. În cazul tratamentului cu clopidogrel (un antiagregant plachetar, blocant al receptorilor ADP de la nivelul trombocitelor) s-au descoperit variante alelice ale unor gene implicate în modularea absorbţiei intestinale a acestuia (*ABCB1*), în activarea sa metabolică (*CYP3A5* şi *CYP2C19*), precum şi în activitatea sa biologică (*P2RY12* şi *ITGB3*). Deşi aceste date vor trebui mai amplu confirmate înainte de a le utiliza în practică, ele ne arată că în viitorul apropiat un *tratament individualizat*, bazat pe structura genetică a pacientului, ar putea să amplifice eficacitatea şi să reducă toxicitatea potenţială a medicamentelor. Odată ce un polimorfism este cert corelat cu răspunsul la un anumit medicament, pacienţii vor fi evaluaţi genetic înaintea începerii unui tratament individualizat.

2. Hipertensiunea arterială esenţială

Hipertensiunea arterială esenţială (HTE) sau primară este o boală frecventă (afectează peste 20% din populaţia adultă în ţările dezvoltate) şi o problemă importantă de sănătate publică (fiind un factor major de risc pentru boli cardiovasculare, renale şi accidente vasculare cerebrale). De aceea, era firesc ca acest domeniu să fie amplu analizat pentru a se stabili etiopatogenia HTE şi, pe această bază, pentru a identifica cele mai bune soluţii terapeutice.

Existenţa unei componente ereditare în producerea HTE a fost sugerată de incidenţa familială crescută a bolii (chiar în condiţiile în care diferiţi membri ai aceleiaşi familii trăiesc în medii diferite, cu factori

6. E de la *epsilon*.

BCU TIRGU MURES

de risc variaţi), frecvenţa mai crescută la bărbaţi şi la anumite grupuri etnice (de exemplu, afro-americanii).

Ereditatea HTE a fost mulţi ani un subiect de confruntare între două ipoteze:

- Pickering (1959) considera că tensiunea (presiunea) arterială (TA) – la fel ca şi alte caractere umane (talia, inteligenţa ş.a.) – este un caracter cantitativ, cu o *distribuţie continuă* în populaţie şi cu determinism poligenic; HTE (valori mai mari de 140 mmHg pentru TA sistolică) ar reprezenta variaţia extremă (+2,5DS) a acestei distribuţii.
- Platt (1947) credea că TA are o *distribuţie bimodală* şi un determinism monogenic.

În timp, s-a dovedit că distribuţia bimodală a TA era probabil un artefact şi că *HTE are o etiologie multifactorială* (ca şi multe alte boli comune ale adultului), fiind produsă de intervenţia mai multor gene de susceptibilitate al căror efect este modulat de interacţiuni între diferite gene precum şi între gene şi mediu. Trebuie însă să precizăm că există *forme familiale de HTE monogenice (mendeliene)* (tabelul 14.3), dar ele afectează o proporţie mică din populaţie.

După stabilirea unui model etiologic multifactorial, s-a încercat determinarea contribuţiei relative a genelor şi a factorilor de mediu în determinismul bolii. Mai multe studii au stabilit că *heritabilitatea* HTE (fracţia genetică din totalul variabilităţii interindividuale) este de 30-60%, iar rudele de gradul I ale bolnavilor au un risc de 3-4 ori mai mare de a face HTE comparativ cu populaţia generală. Totuşi, factorii de mediu (dieta, în special consumul mai mare de sare şi stilul de viaţă – activitatea fizică scăzută, stresul psihoemoţional, fumatul, alcoolul, obezitatea ş.a.) au un rol cauzal important.

Problema esenţială a eredităţii HTE rămâne *identificarea multiplelor gene de susceptibilitate* şi efectul diferitelor variante alelice în modularea TA. În principiu, anumite alele ale unor gene implicate în dezvoltarea HTE ar trebui să fie mai frecvent prezente la hipertensivi decât la normotensivi şi ar trebui să segrege/să se transmită în familie împreună cu HTE; pentru validarea ipotezei „boli comune – variante comune" se evaluează un număr mic de alele, dar cu o frecvenţă în populaţie mai mare de 2-5%(*„variante comune"*).

> La om s-au realizat două tipuri de cercetări: *studii de înlănţuire*, bazate pe o alelă prezentă la perechi de rude afectate (de obicei fraţi) şi *studii de asociaţie*, comparând frecvenţele genice între grupuri mari de hipertensivi şi subiecţi normali. În ambele cazuri se folosesc fie *gene-candidat* specifice (sugerate de fiziopatologia bolii), fie markeri ADN anonimi cu care se *scanează genomul uman*. Aceste studii GWAS folosesc mii de markeri de tipul SNPs, distribuiţi la intervale egale în întregul genom, care se transmit împreună cu genele candidat (*dezechilibru de înlănţuire*), fiind situaţi în apropierea sau în structura lor.

Selecţia **genelor-candidat** s-a făcut pe baza cunoştinţelor recente privind mecanismele şi moleculele implicate în reglarea TA şi în patogenia HTE. Un rol major îl au rinichii, suprarenalele, sistemul nervos care participă la mecanismul presiune-natriureză controlat de sistemul renină-angiotensină (SRA)

Tabelul 14.3. Forme monogenice de hipertensiune arterială

Sindromul	OMIM	Gene implicate	Localizare cromozomială	Funcţia normală a genei/ Mecanismul bolii
Deficienţa de cortisol 11 beta-ketoreductaza	# 218030	*HSD11B2*	16q22	Pierderea funcţiei 11-β-hidroxisteroid dehidrogenazei tip 2 permite activarea de către cortisol a receptorilor mineralocorticoizi renali.
Hiperaldosteronismul familial tip I	# 103900	*CYP11B1* *CYP11B2*	8p21	Fuziunea genelor CYP11B2 şi CYP11B1 plasează producţia aldosteronului sub controlul ACTH.
Deficienţa 17-alfa-hidroxilazei	# 202110	*CYP17A1*	10q24.3	17-α-hidroxilaza este necesară pentru sinteza cortisolului. Deficienţa sa determină creşterea nivelului ACTH şi a sintezei de dezoxicorticosteron şi corticosteron ce produc hipertensiune.
Sindromul Liddle (pseudo-hipo-aldosteronismul tip I)	# 177200	*SCNN1B* *SCNN1G*	16p13-p12	Reabsorbţia excesivă a sodiului la nivel renal este consecinţa activării constitutive a canalului epitelial de sodiu datorită unor mutaţii cu trunchierea proteinei fie la nivelul subunităţii β, fie a subunităţii γ a acestui canal.
Pseudo-hipoaldosteronismul tip II (sindromul Gordon)	# 145260	*WNK1* *WNK4*	12p13 17q21-q22	Aceste gene codifică protein-kinaze care influenţează reabsorbţia paracelulară a ionilor în nefronii distali.
Hipertensiunea AD cu debut precoce şi exacerbare severă în cursul sarcinii	# 605115	*NR3C2*	4q31.1	Gena codifică receptorul nuclear pentru mineralocorticoizi; mecanismul bolii este incomplet definit.
Sindromul Bardet-Biedl tipurile 2 şi 4	* 600374	*BBS2* *BBS4*	16q21 15q22.3-q23	Genele codifică proteine din clasa noua a chaperoninelor; mecanismul bolii nu este bine cunoscut.

(figura 14.1); intervin însă şi alţi factori: endocrini, vasculari, endoteliali.

Au fost identificate şi localizate genele ce codifică diferite componente ale SRA:

- gena *ADD1* (α-adducină, senzor al modificărilor presiunii hidrostatice, situată pe cromozomul 4p16);
- gena *AGT* (pentru angiotensinogen, situată pe cromozomul 1q42-q43);
- gena *REN* (pentru renină situată pe cromozomul 1q32);
- gena *ACE* (pentru enzima de conversie a angiotensinei, situată pe cromozomul 17q23);
- gena *AT1R* (pentru receptorul angiotensinei, situată pe cromozomul 3q21);
- gena *CYP11B2* (pentru aldosteron-sintetază, situată pe cromozomul 8q21);
- gena *SCNN1B* (pentru subunitatea-β a canalului de sodiu nonvoltaj dependent tip 1, situată pe cromozomul 16p13-p12);
- gena *GJA5* (pentru conexina 40, din structurile joncţionale ale celulelor endoteliale din arteriola eferentă şi aparatul juxta-glomerular).

Pentru fiecare dintre aceste gene s-au identificat, prin studii de înlănţuire genică, mai multe variante alelice şi s-a analizat efectul lor asupra concentraţiei plasmatice a produsului, asupra reabsorbţiei tubulare de sodiu sau asupra TA. Rezultatele obţinute până în prezent – mai ales în studiul *AGT* şi *ACE* – nu sunt totuşi concludente, iar atunci când există o asociaţie semnificativă cu HTA – de exemplu, gena pentru angiotensinogen[7] – riscul atribuit genei este modest. Datele obţinute prin studiile de înlănţuire genică permit totuşi câteva concluzii:

- este puţin probabil ca o genă majoră sau o variantă comună să fie implicată în genetica HTA primare;
- efectul unor variante alelice ale unor gene implicate în SRA depinde de vârstă şi de unii factori de mediu (de exemplu, alimentaţia, aportul de sodiu);
- efectul unor medicamente antihipertensive noi (inhibitori de ACE, blocanţi de receptori AT, blocanţi receptori adrenergici beta-2 şi beta-3) poate fi influenţat de polimorfismul genelor, dar pentru moment nu există consecinţe practice imediate (de exemplu, stabilirea „profilului alelic" al genelor pacientului); aceasta nu înseamnă că ele nu vor fi identificate în viitorul apropiat.

Introducerea metodelor de analiză a asocierilor la nivelul întregului genom (GWAS) a avut ca obiectiv identificarea unor *variante comune* asociate cu TA sau HTE. S-au efectuat multiple studii GWAS, pe loturi mari, care au identificat loci noi asociaţi cu TA sistolică sau diastolică şi cu HTE, dar multe din genele asociate cu aceşti loci nu sunt implicate în căile majore de reglare a TA[8] şi efectele acestor asocieri

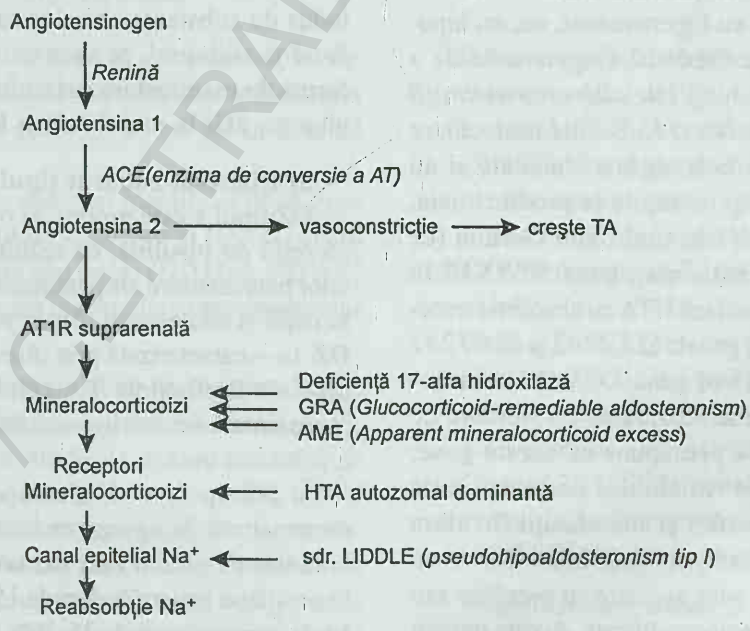


Figura 14.1. Sistemul renină-angiotensină-aldosteron şi formele monogenice de hipertensiune arterială (toate au în comun creşterea reabsorbţiei de Na)

7. Gena *AGT* are două variante (T235M şi T174M, în care treonina este înlocuită cu metionina în poziţiile 235 şi174) care se asociază semnificativ cu HTA; asocierea a fost demonstrată numai în anumite populaţii şi nu a fost confirmată în altele, probabil datorită unei diversităţi genetice ale acestor populaţii.
8. Numai două regiuni identificate – 1q36 şi 10q24 – conţin gene cunoscute a influenţa TA: *CYP17A1* (implicată în hiperplazia congenitală de suprarenală şi HTA hipokaliemică) *şi respectiv NPPA / NPPB* (gene asociate cu concentraţia peptidului natriuretic).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sunt mici, explicând doar o mică parte din contribuția factorilor genetici (heritabilitate) la HTE. Deci, studiile GWAS nu au confirmat încă rolul presupus al unor variante comune care să aibă efecte substanțiale asupra TA sau HTA, nu au descoperit noi ținte terapeutice și nici posibilități de terapie personalizată în HTE.

Printre genele noi de susceptibilitate la HTE identificate prin studiile GWAS amintim: *STK39* (codifică o serin-treonin-kinază), *MTHFR* (metilen tetrahidofolat reductaza), *NT5C2* (nucleotidază citoplasmatică), *PLCD3* (fosfolipază), *FGF5* (factor de creștere fibroblastică), *ATXN2* (ataxină), *ZNF652* (proteină cu degete de zinc), *PLEKH7* (plextrină), *ATP2B1* (transportor de calciu ATPazic), *CACNB2* (canal de calciu voltaj-dependent), *CPLX3* (complexină) etc.

În aceste condiții, heritabilitatea TA și HTE ar putea fi rezultatul unor *variante rare într-un număr mare de gene*, fiecare cu o contribuție de 1-2% la variația genetică, în funcție de caracteristicile (fondul) genetice ale unei anumite populații; între aceste gene organizate într-o *rețea* ar putea există interacțiuni epistatice ce duc la creșterea TA, fără a se identifica o anomalie evidentă a parametrilor umorali, hormonali sau structurali; prin urmare, impactul unei anumite variante alelice asupra TA ar trebuie să fie evaluat în contextul interacțiunilor cu alte gene.

În acest context, a revenit în actualitate studiul unor boli monogenice rare (transmise de obicei autozomal recesiv) asociate cu hipertensiune sau cu hipotensiune – deoarece se crede că singura cale de a modifica TA pe termen lung este *alterarea abilității renale de reabsorbție a Na și K*. Bazele moleculare ale unora dintre aceste boli au fost elucidate și au fost identificate genele și mutațiile ce produc boala. De exemplu, gena *WKN1* în sindromul Gordon (ce asociază HTA și hiperkaliemia), gena *SCNN1B* în sindromul Liddle (ce asociază HTA cu absorbția excesivă a Na la nivel renal), genele *SLC12A3* și *SLC12A1* în sindromul Gitelman sau gena *KCNJ1* în sindromul Barter – ambele fiind sindroame cu pierdere de sare și hipotensiune. Se presupune că aceste gene, ce intervin în abilitatea rinichiului de reabsorbție a sodiului și apei, pot suferi și alte mutații (în afara celor ce produc boala) care, pot duce la creșterea sau scăderea TA după cum sunt asociate cu pierdere sau câștig de funcție a proteinelor codificate. Aceste mutații ce produc variante alelice rare (imposibil de identificat prin GWAS) ar putea fi identificate prin secvențierea acestor gene dar și a regiunilor învecinate care ar putea conține secvențe reglatoare.

În final remarcăm faptul că cele două ipoteze antagonice despre rolul eredității în HTE, formulate de Pickering și Platt ar putea fi fiecare *parțial corecte*.

3. Diabetul zaharat[9]

Diabetul zaharat (DZ) reprezintă un grup eterogen de afecțiuni, caracterizate prin hiperglicemie cronică, care afectează (în țările dezvoltate) circa 6% din populație, fiind un factor major de risc pentru boli cardiovasculare, accidente cerebrale, nefropatie și cecitate. DZ are o etiologie complexă, multifactorială, incomplet elucidată, care implică acțiunea concomitentă a unor gene multiple – ce determină susceptibilitatea la diabet – și a unor factori de mediu, care declanșează apariția bolii la bolnavii susceptibili (de exemplu, infecțiile cu enterovirusuri de tip Coxsakie B). DZ este un prototip de boală multifactorială.

Există două tipuri majore de DZ:

- tipul 1 – numit și diabetul insulino-dependent (IDDM) sau diabetul juvenil;
- tipul 2 – numit și diabetul noninsulino-dependent (NIDDM) sau diabetul adultului, de 6-10 ori mai frecvent decât tipul 1.

Caracteristicile celor două tipuri de DZ sunt sintetizate în tabelul 14.4. Menționăm faptul că mai există și alte *forme specifice de DZ* (boli monogenice, DZ indus de substanțe chimice sau infecții etc.) și *diabetul gestațional*, pe care unii autori îl consideră o formă de manifestare a riscului de a dezvolta un DZ ulterior, atât la mamă, cât și la copil[10].

a) Diabetul zaharat tipul 1

DZ tipul 1 este produs de o deficiență absolută în secreția de insulină, ca rezultat al distrugerii celulelor beta insulare ale pancreasului, fiind mai frecvent la copii și adolescenți. Boala prezintă două subtipuri: DZ 1a – caracterizată prin *distrugerea autoimună* mediată de limfocitele T a celulelor beta și DZ 1b – reprezentată de *distrugerea idiopatică/non-autoimună* a celulelor beta.

În DZ tip 1 există o componentă genetică certă, demonstrată de agregarea familială și riscul crescut la rudele de gradul I ale bolnavilor (6% *versus* 0,4% în populația generală, deci de 15 ori mai mare) (tabelul 14.5), concordanța de 35-50% la gemenii MZ și frecvența crescută în anumite grupuri etnice.
Surse: Jorde et al, 1999;NHS (USA) 2002

Cel puțin 20 de regiuni genomice au fost asociate cu DZ tipul 1, dar cu excepția genelor HLA de clasă II

9. Pentru cei interesați de acest subiect recomandăm excelenta monografie editată de academicianul Dan Cheța, *Genetics of diabetes – the truth unveiled*, Editura Academiei Române, 2010.
10. Expunerea *in utero* la hiperglicemie crește de circa 8 ori riscul ca noul-născut să facă, la adolescență, un DZ.

Tabelul 14.4. Caracteristicile majore ale DZ de tipul 1 şi de tipul 2

Caracteristici	DZ tipul 1	DZ tipul 2
Prevalenţă	1 la 200 persoane	3 la 100 persoane
% din toate cazurile de DZ	15-25%	75-85%
Vârstă de debut	de obicei sub 40 de ani	de obicei peste 40 de ani (excepţie tipul MODY)
Secreţie de insulină	zero	prezentă, dar redusă
Rezistenţă la insulină	nu	da
Autoimunitate	da	nu
Asocierea cu HLA	da	nu
Obezitate	foarte rar	frecventă
Concordanţa la gemenii MZ	35-50%	≥ 90%
Risc de recurenţă în fratrie	1-6%	10-15%

Tabelul 14.5. Riscul de DZ al rudelor bolnavilor diabetici

Bolnav de DZ (tipul 1 sau tipul 2)	Rude cu risc	Risc (în cazul DZ tipul 1)	Risc (în cazul DZ tipul 2)
Mama	Copii	3%	15%
Tatăl	Copii	6-9%	15%
Ambii părinţi	Copii	30%	75%
Alt membru al familiei	Fraţii sau surorile sale	6-10%	10%
	Frate geamăn MZ Frate geamăn DZ	35-50% 5-10%	90% 10%
	Fraţii sau surorile sale dacă sunt HLA identici	20%	–
	Copiii săi	10%	33%

Surse: Jorde *et al.*, 1999; NHS (USA) 2002

(DP, DQ, DR), care realizează cel puţin 40% din agregarea familială şi circa 60% din susceptibilitatea la DZ tip 1, celelalte asociaţii au un rol individual mult mai mic.

Studiile genelor candidat au identificat două gene majore de susceptibilitate – *IDDM1 şi IDDM2* şi alţi trei loci cu o contribuţie mai mică: *IDDM12, PTPN22 şi IL2RA/C25* – implicate în dereglarea mecanismelor de toleranţă imună.

- Locusul *IDDM1* este situat pe cromozomul 6p21 în regiunea genelor HLA de clasă II: *HLA DR, DQ şi DP.* Primele studii de asociere au stabilit că 95% din bolnavii de DZ1 au genele *HLA-DR3* şi/sau *HLA-DR4*, în comparaţie cu 50% la persoanele neafectate. Ulterior atenţia a fost concentrată asupra polimorfismelor genelor *HLA-DQ* strâns înlănţuite cu *HLA-DR*; s-au descoperit două alele de risc în gena *DQB1* (în haplotipul *DR4*, ce codifică antigenele DQ7 şi DQ8) şi apoi o alelă de risc în gena *DRB1*(în haplotipul *DR3*, ce codifică antigenul DQ2). Studiile ulterioare au confirmat că genele *HLA DQB1* şi *HLA DRB1* sunt determinanţii majori ai riscului genetic la DZ1 şi au identificat în regiunea complexului major de histocompatibilitate alte gene de risc, HLA (de exemplu, *HLA DPB1*) sau non HLA.
- Locusul *IDDM2* corespunde unui microsatelit (VNTR) din regiunea 5' necodantă a genei *INS* pentru insulină, situată pe cromozomul 11p15.
- Locusul *IDDM12* situat pe 2q33 corespunde genei *CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4).*
- Gena *PTPN22* (*protein tyrosin phosphatase non receptor 22*) situată pe 1p13.3, ce codifică o protein-fosfatază cu activitate tirozin-kinazică, numită LYP, specifică celulelor limfoide.
- Gena *IL2RA/CD25* situată pe cromozomul 10p15 ce codifică subunitatea alfa a receptorului 2 pentru interleukină; cunoscut ca CD25.

Studiile recente bazate pe GWA au identificat alte regiuni din genom asociate cu DZ tip 1: *IFIH1* (codifică o proteină implicată în apoptoză ce este activată de prezenţa picornavirusurilor, precum virusul coxsackie tip B4 implicat în etiologia bolii), *ERBB3* (receptor tirozin-kinazic), *SH2B3* (proteină adaptor), *TRAFD1* (proteină cu degete de zinc), *PTPN11* (tirozin-fosfatază), *CLEC16A* (lectină Ca-dependentă) etc. În final menţionăm că au fost descoperite şi variante alelice care

au un rol protectiv față de DZ1, cum ar fi gena *HLADR2* și gena *VDR* pentru receptorul vitaminei D (numeroase studii au arătat rolul protector al vitaminei D asupra celulelor beta pancreatice, deficitul ei asociindu-se cu o scădere a secreției de insulină).

b). Diabetul zaharat de tipul 2

DZ de tipul 2, care afectează circa 10% din populația țărilor dezvoltate, este produs printr-un dublu defect: *secreția inadecvată de insulină de către celulele beta* și *rezistența la acțiunea insulinei*, atât în țesuturile periferice (mușchi, adipocite), cât și în celulele beta, determinată de modificări ale receptorilor de insulină sau ale altor molecule implicate în fixarea, transportul intracelular și metabolizarea glucozei.

Factorii de risc pentru DZ de tipul 2 sunt: vârsta, alimentația, obezitatea, inactivitatea fizică, greutatea mică la naștere ș.a. Există însă și o vulnerabilitate genetică mai importantă decât în DZ de tipul 1, demonstrată mai ales de concordanța ≥ de 90% a DZ la gemenii MZ și riscul crescut de recurență la rudele de gradul I ale bolnavului (tabelul 14.5). La acestea se adaugă existența unor diferențe etnice în prevalența DZ tipul 2, precum și a unor vulnerabilități diferite în populații diferite (selectate ca răspuns la diferite presiuni evolutive).

Astfel, s-a identificat într-o populație de mexicani din America o genă de susceptibilitate, *NIDDM1*, localizată pe brațul lung al cromozomului 2 ce interacționează cu o genă de pe cromozomul 15; în populațiile finice din nordul Europei s-au identificat genele *NIDDM2* (pe cromozomul 12) și *NIDDM3* (pe cromozomul 20).

Studiile genetice în DZ tipul 2 au relevat existența unor forme rare monogenice și a unei forme comune, multifactoriale.

DZ tipul 2 produs prin mutații monogenice este reprezentat de DZ de tip juvenil cu debut la maturitate (MODY – de la *Maturity-Onset Diabetes of the Young*) și alte sindroame genetice cu rezistență severă la acțiunea insulinei: sindromul Wolcott-Rallison (diabet asociat cu displazia epifizelor, produs prin mutația genei *EIF2AK3*), diabetul neonatal tranzitoriu și permanent (mutații ale genelor *KCNJ11* sau *ABCC8*) etc.

MODY este responsabil de 2-5% dintre toate cazurile de DZ tipul 2; se transmite autozomal dominant și este produs prin defecte primare în sinteza de insulină. Au fost descrise 6 tipuri de mutații: în gena pentru glucokinază – *GCK* (MODY 2); în genele ce codifică factorii de transcripție hepatică ce stimulează celulele beta: *HNF-1a* (MODY 3), *HNF1B* (MODY 5), *HNF4A* (MODY 1); în gena pentru factorul de transcripție pancreatică ce stimulează celulele beta: *IPF-1* (MODY 4); în gena *NEUROD1 (neurogenic differentiation 1)*; în gena pentru insulină – *INS* (MODY 7). Studiile de genetică moleculară în MODY au permis elucidarea funcției celulelor beta și înțelegerea patogeniei altor forme de DZ.

Formele comune de DZ tip 2 sunt multifactoriale. Studiile de înlănțuire și asociere genică efectuate înainte de utilizarea studiilor GWA s-au identificat mai multe gene de predispoziție, precum: *CAPN-10* (pe 2q37) – codifică calpaina 10, o protează citoplasmatică cu rol posibil în rezistența la insulină; *ENPP1* (pe 6q22-q23) – codifică o fosfodiesterază alcalină implicată în căile de semnalizare activate de receptorul pentru insulină; *TCF7L2* (pe 10q25.3) – codifică un factor de transcripție al căii de semnalizare Wnt, implicat în controlul masei celulelor beta pancreatice; *ADPOQ* (pe 3q27) – codifică adiponectina, o proteină secretată de adipocite cu rol important în acțiunea insulinei; *IRS1* (pe 2q36) și *IRS2* (pe 13q34) din familia receptorilor pentru insulină, implicate în rezistența la acest hormon.

Preponderența transmiterii pe cale maternă a riscului pentru DZ tipul 2 s-ar putea explica printr-o formă particulară de *diabet mitocondrial* produs de modificări ale ADNmt, calitative (deleții sau mutații) sau cantitative (scăderea nivelului plasmatic al ADNmt prin reducerea biogenezei mitocondriilor; mamele cu nivel scăzut al ADNmt nasc frecvent copii cu greutate mică și cu risc crescut de DZ tipul 2).

Studiile GWAS efectuate până în prezent au identificat până în prezent peste 30 de noi gene asociate cu riscul pentru DZ tip 2. Împreună, ele explică circa 10% din susceptibilitatea la boală. Una dintre surprizele cele mai mari ale acestor studii este faptul că majoritatea genelor identificate în urma acestor studii sunt implicate în controlul funcțiilor celulelor beta pancreatice, subliniind rolul esențial al defectelor acestor celule în inițierea bolii. O serie dintre genele identificate au relevat de asemenea o serie de noi căi patofiziologice implicate în producerea bolii. De exemplu, gena *SLC30A8* care codifică un transportor de zinc, subliniază rolul acestui microelement în împachetarea și secreția granulelor de insulină și deschid calea dezvoltării unor noi modalități terapeutice.

La bolnavii cu DZ tipul 2 există o susceptibilitate individuală clară la anumite complicații (nefropatie diabetică, neuropatii, retinopatii sau boli cardiovasculare). Studiile genetice au început să identifice asemenea gene de susceptibilitate: *ELMO1* și *PLEKHH2* sunt asociate cu riscul pentru nefropatia diabetică, *SERPING1* și *VEGF* sunt asociate cu riscul pentru retinopatia diabetică etc.

Ca urmare, studiile genetice în cazul DZ au adus date prețioase pentru înțelegerea bolii și identificarea persoanelor cu risc, dar nu au elucidat toate aspectele eredității bolii. Ele sunt continuate și vor aduce cu siguranță elemente noi.

4. Astmul bronşic

Astmul bronşic este o boală pulmonară obstructivă reversibilă care se asociază cu hiperactivitate bronşică (bronhospasm) şi cu inflamaţia căilor aeriene. Incidenţa astmului variază în diferite populaţii între 5 şi 10%, fiind mai frecvent la copii.

Etiologia astmului bronşic este multifactorială: factorii de mediu (alergeni, poluanţi, infecţii virale) declanşează boala la persoanele susceptibile. Participarea unor factori genetici care determină predispoziţia la astm şi **atopie** este susţinută, în general, de caracterul familial frecvent al bolii (astm sau alergie ori niveluri crescute de IgE), riscul crescut de boală la rudele pacientului (de 2-5 ori mai mare decât în populaţia generală) şi incidenţa mai mare la gemenii MZ comparativ cu gemenii DZ (heritabilitatea bolii a fost estimată, în diferite populaţii, a se situa între 30 şi 70%). De menţionat că atopia (predispoziţie de a dezvolta un răspuns mediat de IgE) este cel mai puternic factor predispozant în astm, iar nivelurile crescute de IgE se corelează cu expresia clinică a alergiei şi a astmului.

Identificarea *genelor de risc* – pentru astm sau fenotipuri intermediare (nivelul de IgE, hiperreactivitatea bronşică, atopia) – a fost şi este dificilă, deoarece genele responsabile de iniţierea bolii pot fi diferite de genele responsabile de progresia şi/sau severitatea ei. Prin cele trei categorii de studii ale genelor de susceptibilitate (înlănţuire genică, gene candidat, GWAS) prezentate la începutul capitolului – au fost identificate peste 100 de gene asociate cu astmul bronşic şi fenotipurile înrudite, dar numai 25 au fost validate prin studii replicative; ele se corelează cu sistemul imun sau modularea inflamaţiei. Totuşi unele dintre aceste gene nu au fost decelate în alte populaţii şi fenomenul are două explicaţii ipotetice: fie ele produc astm când se asociază cu anumite expuneri specifice din mediu, fie astmul bronşic este o colecţie de mai multe boli şi unele dintre aceste gene au rol numai la un set de bolnavi.

Fără a intra în detalii, genele de susceptibilitate în astm se pot împărţi în patru categorii:

- gene implicate în funcţia de barieră a celulelor epiteliale bronşice, prima linie de apărare imună; de exemplu, genele care codifică defensina beta-1 (un peptid antimicrobian), uteroglobina, unele chemokine;
- gene implicate în detecţia patogenilor şi alergenilor; ele codifică receptori extracelulari (*CD14, TLR2* ş.a.) sau intracelulari (*NOD1/CARD4*);
- gene implicate în răspunsul imun adaptativ mediat de limfocitele T_H2 (*IL-13, GATA3, TEBX2, IL4 ş.a.*, ce intervin în diferenţierea şi funcţia celulelor T_H2);
- gene implicate în medierea răspunsului tisular la alergeni şi stresul oxidativ (*ORMDL3, DENND1B, ADAM3, COL29A ş.a*).

Efectul medicaţiei antiastmatice poate fi influenţat de polimorfismele genelor pentru receptorul adrenergic 2 şi receptorul pentru glucocorticoizi sau de cele ale genei pentru lipooxigenază; anumite variante alelice determină un răspuns redus la medicaţie.

5. Bolile neurodegenerative: boala Alzheimer şi boala Parkinson

Bolile neurodegenerative sunt afecţiuni neurologice cronice produse prin pierderea progresivă a neuronilor. În funcţie de regiunea SNC afectată şi de prezenţa unor markeri celulari şi moleculari se deosebesc mai multe tipuri, care au o etiologie multifactorială şi/sau monogenică. Cele mai frecvente afecţiuni sunt boala Alzheimer şi boala Parkinson; alte forme mai rare sunt boala Huntington, ataxiile spinocerebeloase, scleroza laterală amiotrofică, atrofia musculară spinală ş.a.

a. Boala Alzheimer

Boala Alzheimer (5% dintre persoanele peste 70 de ani) este cea mai frecventă cauză de demenţă. Se caracterizează prin *pierderea neuronilor* (în special în cortex – atrofie cerebrală corticală – şi hipocamp) ce produce o deteriorare intelectuală lentă, dar progresivă (pierderea memoriei, afazie, agnozie, dezorientare temporo-spaţială) până la demenţă. Aceste fenomene se asociază cu o *insuficienţă sinaptică* primară (disfuncţia neurotransmiţătorilor, în special o deficienţă marcată de acetilcolină), *depleţia neurotrofinei* şi *disfuncţie mitocondrială*.

Modificările anatomopatologice specifice bolii Alzheimer sunt plăcile senile de *β-amiloid*[11] extraneuronale şi agregatele neurofibrilare intraneuronale, formate prin hiperfosforilarea proteinei TAU.

Boala Alzheimer (BA) este o afecţiune cu heterogenitate genetică.

Circa 25% din cazurile de boală Alzheimer sunt familiale şi se subîmpart în două grupe: boală Alzheimer *cu debut precoce* (sub 60-65 de ani) şi boală Alzheimer *cu debut tardiv* (peste 65 de ani).

- Boala Alzheimer *cu debut precoce* (60% din cazurile familiale, 13% fiind transmise autozomal dominant)

11. *β-amiloidul* rezultă prin clivarea enzimatică (produsă de secretazele α, β şi γ) a APP – proteina precursoare a β-amiloidului (*amyloid beta A4 protein*), codificată de gena *APP* situată pe cromozomul 21. Bolnavii cu trisomie 21 au hiperexpresia acestei gene şi dezvoltă precoce fenomene de boală Alzheimer, la circa 40 de ani.

se prezintă sub trei subtipuri principale: BA1 (10-15%) – produs de mutațiile genei *APP* (21q21) – ce codifică proteina precursoare a β-amiloidului; BA3 (20-70%) – produs de mutațiile genei *PSEN1* (14q24.3) – ce codifică presenilina 1; BA4 (sub 5%) – produs de mutațiile genei *PSEN2* (1q31-q42) – ce codifică presenilina 2; există și cazuri familiale rare care nu sunt determinate de mutații în cele trei gene, ci în alte gene, încă neidentificate.

- Boala Alzheimer *cu debut tardiv*, sau subtipul BA2 este asociată cu alela ε4 a genei *APOE* (19q13.2) ce codifică o moleculă *chaperone*, care promovează depozitarea *b-amiloidului* și fosforilarea proteinei TAU.

Majoritatea pacienților cu boală Alzheimer sunt însă cazuri sporadice, cu determinism multifactorial și rezultă din combinația a trei categorii de factori etiologici:

- vârsta – principalul factor de risc în boală Alzheimer;
- predispoziția genetică – determinată de variante alelice ale mai multor gene de risc, precum *APOJ* (care codifică: apolipoproteina J), *TOMM40* (codifică un transportor al membranei mitocondriale), *SORL1* (codifică un receptor de tip Sortilin implicat în clivarea APP), *MAPT* (codifică proteina TAU) ș.a.
- expunerea la unul sau mai mulți agenți de mediu: traumatisme craniene, virusuri, toxine, concentrații crescute de colesterol (la vârsta medie), anestezice generale, activarea cronică a axei gluco-corticoizilor, deficit estrogenic la femeile postmenopauză etc.

Descifrarea patogeniei moleculare a bolii Alzheimer continuă și sunt speranțe de identificare a unor molecule terapeutice care ar putea încetini evoluția bolii. Un exemplu îl constituie inhibitorii de secretază care scad producția și depozitele de amiloid.

b. Boala Parkinson

Boala Parkinson (0,5-1% dintre persoanele peste 65 de ani) este, ca frecvență, a doua boală neurodegenerativă după boala Alzheimer. Se caracterizează prin distrugerea progresivă a neuronilor dopaminegici din sistemul extrapiramidal (în special substanța neagră și corpii striați), asociată cu prezența unor depozite de proteine ubicuitinate[12] în citoplasma neuronilor (corpi Lewy) sau prelungirile lor (neurite Lewy) și depleție de dopamină.

Boala Parkinson se manifestă clinic prin: tremurături lente, caracteristice, ale mâinilor și capului, ce persistă în repaus, hipertonie extrapiramidală, bradikinezie, rigiditate și instabilitate posturală. Vârsta de debut a simptomelor este variabilă. 20-50% din cazuri evoluează spre depresie și/sau demență.

Mult timp s-a considerat că boala Parkinson este produsă de factori de mediu (traumatisme craniene, toxine etc.). Rolul posibil al unor factori genetici a fost acceptat după ce la un grup de pacienți cu forme familiale, monogenice, de boală Parkinson au fost identificate diferite mutații genice. În prezent sunt identificați 13 loci PARK, dar numai cinci gene au fost cert implicate în forme cu transmitere autozomal dominantă (genele *SNCA* și *LRRK2)* sau recesivă (genele *PARKN*, *DJ-1* și *PINK1*).

- PARK1 – conține gena *SNCA* (pe cromozomul 4q21) care codifică α-sinucleina, componenta majoră a corpilor Levy, cu rol în transmiterea sinaptică;
- PARK8 – cu gena *LRRK2* (pe cromozomul 12p11.2) ce codifică dardarina, o protein kinază 2 cu repetiții bogate în leucină;
- PARK2 – conține gena *PARKN* pentru parkină, o proteină din familia E3 ubiquitin-ligazei, cu rol neuroprotectiv față de variate agresiuni toxice și modularea funcțiilor mitocondriale;
- PARK7 – cu gena DJ-1 care codifică o proteină exprimată în multiple țesuturi și localizată în mitocondrii, având rol antioxidant;
- PARK6 – cu gena *PINK1* ce codifică o kinază mitocondrială.

Studiul acestor forme rare, monogenice, de boală Parkinson a adus date interesante pentru descifrarea etiopatogeniei bolii Parkinson, rolul major al disfuncției mitocondriale în această afecțiune (vezi capitolul 13) și introducerea terapiei substitutive cu levo-DOPA; ele reprezintă însă doar 5-10% dintre bolnavii cu Parkinson. Restul cazurilor au un determinism multifactorial, ce implică variantele alelice a numeroase gene de susceptibilitate: *NR4A2* (codifică un receptor nuclear esențial pentru diferențierea neuronilor dopaminergici din substanța neagră); *SNCAIP* (codifică sinfilina-1, substrat pentru parkină); *MAPT* (codifică proteina TAU) etc. Au fost descrise de asemenea variante alelice în genele *SNCA* și *LRRK2* implicate în formele monogenice.

6. Psihozele

Numeroase studii genetice au demonstrat fără echivoc existența unei componente genetice importante în două dintre psihozele majore – schizofrenia și boala (psihoza) afectivă bipolară – cu determinism multifactorial și, foarte probabil, heterogenitate genetică.

12. Ubicuitina este o proteină prezentă în toate celulele, cu rol în reglarea procesului de degradare proteolitică a altor proteine („marcate" prin fixarea ubicuitinei) într-un proteazom.

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

a. Schizofrenia

Schizofrenia (1% din populația generală) se caracterizează (după *DSM-IV*, 1994) prin: ideație incoerentă și delirantă, halucinații, disociere a personalității, izolare socială și autism (repliere în sine însuși), comportament catatonic sau dezorganizat. Riscul empiric de recurență la rudele de gradul I ale bolnavului este de circa 6-12% (deci aproape de 10 ori mai mare decât în populația generală), crește cu numărul bolnavilor și scade la rudele de gradul II (circa 3%). Concordanța bolii la gemenii MZ este de 50%, iar la gemenii DZ de numai 12%; heritabilitatea a fost calculată la 17%. Toate acestea demonstrează existența unei componente genetice importante. Dar, în ciuda a numeroase studii de înlănțuire și asociere și a identificării unor regiuni cromozomiale în care ar putea fi localizate genele de susceptibilitate la schizofrenie rezultatele au fost modeste. Explicațiile posibile ar fi: lipsa unei definiții fenotipice valide, absența unei teorii patogenice certe pentru studiul genelor candidat și, foarte probabil, implicarea mai multor gene cu efecte mici și diferite în familii diferite.

Rezultatele studiilor recente de asociere la nivelul întregului genom (GWAS) pledează pentru ipoteza unei combinații de alele relativ comune, dar cu efecte mici (de exemplu, gena *ZNF804A*, care codifică o proteină cu degete de zinc) cu alele rare și efecte mai mari (de exemplu, gena *NRG1* ce codifică neuregulina-1 sau gena *NRXN1* – ce codifică neurexina 1, ambele proteine având un rol important în sistemul nervos ca molecule de adeziune și receptori)[13]. Au mai fost descoperite variații rare ale numărului de copii (CNV) – de exemplu, deleții 1q21.1 și 15q13 – cu efecte mai mari pentru riscul de schizofrenie. Rezultatele obținute în ultimii ani generează mai mult optimism pentru descifrarea mecanismelor patogenice ale schizofreniei. Interesant pare faptul că gena *ZNF804A* (în schizofrenie) și gena *CACNA1C* (în psihoza bipolară) cresc riscul pentru ambele afecțiuni, fapt ce sprijină ipoteza că aceste afecțiuni nu sunt etiologic distincte și ar putea avea un mecanism fiziopatologic comun.

b. Psihoza afectivă bipolară

Psihoza afectivă bipolară sau psihoza maniaco-depresivă (0,5% din populația generală) se caracterizează prin episoade alternative de alterare a dispoziției și a nivelului global de activitate, fie în sensul unei dispoziții euforice și a hiperactivității (manie), fie în sensul unei depresii. Riscul empiric al rudelor de gradul I ale bolnavului este de 5-10%, concordanța la gemenii MZ este de 79%, iar heritabilitatea (70%) arată o componentă genetică importantă.

În unele familii, în care boala se transmite autozomal dominant, studiile de înlănțuire au arătat că boala segregă împreună cu markeri polimorfici de pe cromozomii 11p15.5 și Xp11.3. Totuși nu au fost identificate gene specifice. Studiile de înlănțuire au permis localizarea unor loci majori de susceptibilitate la boală pe cromozomii 6q, 8q și 17q. Studiile genomice de asociere (GWAS) au pus în evidență o serie de gene implicate în etiologia psihozei afective bipolare:

- *ANK3* (ankyrina G) codifică o proteină „adaptor", localizată în regiunile proximale ale axonilor, cu rol în reglarea canalelor ionice de sodiu (voltaj-dependente);
- *CACNA1C* (subunitatea alfa 1C a canalelor ionice voltaj dependente de tip L);
- *DGKH* ce codifică diacilglicerol kinaza *eta*, o proteină-cheie în calea fosfatidil-inositol sensibilă la litiu.

Proteinele codificate de aceste gene sunt inhibate în urma administrării de litiu, indicând un posibil mecanism terapeutic al unuia dintre cele mai vechi și efective tratamente folosite pentru această boală.

7. Cancerul

Cancerul este a doua cauză de mortalitate în țările dezvoltate, după bolile cardiovasculare. Etiologia bolii canceroase (la care ne vom referi în detalii în capitolul 18) este multifactorială, implicând factori de mediu (fumatul, alimentația, diferiți cancerigeni chimici, unele infecții virale ș.a.) care produc mutații somatice, precum și factori genetici care determină susceptibilitatea la unele forme de cancer.

Cele mai multe cazuri de cancer (circa 80%) se produc sporadic. Totuși, este bine stabilit că multe dintre formele principale de cancer (de sân, colon, prostată, ovarian) pot avea o agregare familială, iar riscul de recurență este de 2-3 ori mai mare la rudele de gradul I ale bolnavilor (comparativ cu populația generală); el crește cu numărul de bolnavi din familie și, în aceste cazuri, cancerul apare la o vârstă mai tânără. În majoritatea cancerelor s-au identificat gene specifice care, uneori (de exemplu, în cancerul de colon sau de sân), determină și forme ereditare, monogenice. De aceea, medicul practician trebuie să fie deosebit de atent la istoricul familial, precum și la o serie de semne ce pot evoca o formă familială/ereditară de cancer. Acest lucru este important pentru sfatul genetic, supravegherea persoanelor cu risc și diagnosticul presimptomatic. Toate aceste elemente vor fi discutate în capitolul 18.

13. Alte gene de risc pentru schizofrenie ar fi: gena *DTNBP1* pentru disbindină; gena *COMT* – pentru o catecol-metil transferază; gena *NOTCH4* – care codifică o proteină transmembranară, membră a familiei Notch implicată în semnalizarea intercelulară.

8. Obezitatea

Obezitatea (5-15% din populație) este o anomalie metabolică manifestată prin creșterea masei țesutului adipos și un exces ponderal (IMC – indice de masă corporală) de peste 30% în raport cu valorile normale pentru vârstă și sex. Obezitatea reprezintă un factor de risc major pentru mai multe boli comune, în special bolile cardiovasculare și DZ tipul 2.

Obezitatea are un determinism multifactorial în care, alături de factori exogeni (supraalimentație cu alimente bogate în calorii și activitate fizică redusă) sau endogeni (tulburări metabolice sau endocrine) intervin și factori genetici predispozanți. Studiile efectuate pe copii adoptați au arătat că greutatea corpului acestora se corelează semnificativ cu greutatea corpului părinților naturali, iar studiile pe gemeni au evidențiat o concordanță mai mare la MZ și o heritabilitate de 60-80%.

O explicație genetică a creșterii „epidemice" a obezității este ipoteza „genotipului econom" (*thrifty genotype*) potrivit căreia genele „economizatoare de energie" au fost selectate în trecut în condițiile unui aport alimentar insuficient, ajutând strămoșii noștri să supraviețuiască foametei ocazionale. Aceleași gene produc astăzi obezitate în condițiile unei alimentații hipercalorice.

Implicarea certă a unor mecanisme genetice care controlează apetitul și greutatea corpului a fost demonstrată prin studiul unor sindroame monogenice cu obezitate (peste 50, mai frecvente fiind Prader-Willi, Bardet-Biedl, Alstrom, Cohen ș.a.). Deși ele explică doar 2% din cazurile de obezitate, studiul acestor sindroame a elucidat rolul sistemului *hipotalamus-leptină-melanocortină* în reglarea apetitului și metabolismului la om.

Corpul uman are nevoie de o anumită cantitate de țesut adipos pentru funcțiile sale. Adipocitele produc un hormon numit *leptină* care acționează asupra receptorilor de leptină (LEPR) din neuronii nucleului arcuat din hipotalamus (figura 14.2); activarea acestor receptori crește sinteza prohormonului *proopiomelanocortină* (POMC) care este clivat, prin acțiunea proenzimei convertaza 1 (PC1) și carboxipeptidazei (CPE), în ACTH, α-MSH, β-MSH și endorfină. α-MSH acționează asupra unor receptori de melanocortină (MC4R) din nucleul paraventricular („centrul foamei") care inhibă apetitul; un efect invers are neuropeptidul Y. Mutațiile în genele ce codifică leptina, *LEPR*, *PC1*, *CPE* și *MC4R*, produc sindroame monogenice cu obezitate. Astfel de sindroame apar și prin mutații ale unor gene implicate în dezvoltarea neuronală (gena *SIM1*) și integritatea nucleilor hipotalamici (*BDNF* – ce codifică o neurotrofină care se fixează pe receptorii RET).

În controlul greutății corpului și consumului de alimente intervin însă și alți factori: PPARγ – un receptor nuclear (codificat de gena *PPARG*) care stimulează adipogeneza, hormonii grelina (stimulează apetitul) și colecistochinina (inhibă apetitul), dopamina și receptorul DRD2 (controlează sațietatea), receptorii β3 adrenergici și proteinele mitocondriale de decuplare – care controlează termogeneza.

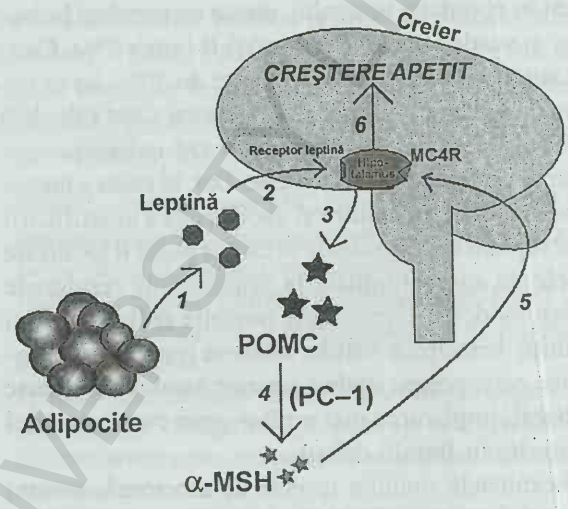


Figura 14.2. Rolul sistemului *hipotalamus-leptină-melanocortină* în reglarea apetitului
(modificat după Wikipedia)

În formele comune de obezitate, care sunt multifactoriale, studiile recente la nivelul întregului genom (GWAS) au identificat, în diferite populații, peste 400 de variante alelice a 127 de gene implicate în producerea obezității (dintre acestea doar 22 au fost „replicate", raportate, de mai multe studii). Multe variante alelice au fost descrise în genele (menționate mai sus) ale căror mutații produc forme monogenice de obezitate. Au fost însă identificate și gene noi; de exemplu, variante ale genei *FTO* (*fat mass and obesity*), de pe cromozomul 16q12.2, au fost asociate cu obezitatea în două studii recente efectuate pe loturi mari în Europa. Această genă controlează expresia multor gene hipotalamice implicate în aportul alimentar.

9. Sindromul dependenței de alcool

Sindromul dependenței de alcool (SDA) sau alcoolismul (după denumirea mai veche)[14] poate fi definit ca o boală primară, cronică caracterizată prin controlul insuficient (necontrolat și impulsiv) al folosirii alcoolului, în ciuda efectelor negative asupra sănătății (psihice, neurologice și organice), relațiilor și reputației sociale.

14. OMS recomandă folosirea termenului „sindromul dependenței de alcool" în locul celui de alcoolism care de altfel a fost îndepărtat din ICD 9. În psihiatrie standardul comun și global al bolilor este DSM; DSM IV folosește în loc de alcoolism doi termini: abuzul și dependența de alcool pentru ca în DSM V să fie reunite într-o singură entitate „boala folosirii alcoolului".

SDA pare să afecteze 3-10% din populație (circa 140 milioane în întreaga lume, după OMS), fiind de 2-3 ori mai frecvent la bărbați.

Se deosebesc două tipuri majore de alcoolism:

- tipul 1 – (2/3 din cazuri) cu debut peste 25 de ani și mare dependență psihologică de alcool; profil psihologic introvertit, băutor solitar.
- tipul 2 – (1/3 din cazuri) cu debut sub 25 de ani, predomină la bărbați și tinde să implice indivizi extrovertiți, cheflii, impulsivi/agresivi.

SDA este o boală care implică, obligatoriu, o cauză de mediu (alcoolul) și alți factori de risc (mediul social, stres, sănătatea mentală), dar este posibil să intervină și o *susceptibilitate genetică la alcoolism*. Studiile familiale au evidențiat o agregare familială semnificativă (mai mare în tipul 2) și un risc de a dezvolta SDA, de 3,5 ori mai mare pentru indivizii cu un părinte afectat, decât al celor fără părinți afectați. Pentru a exclude mediul și obiceiurile comune favorizante dintr-o familie, s-au efectuat studii pe copii adoptați; aceste studii au arătat că urmașii unor părinți cu SDA, crescuți de părinți fără SDA, au un risc de 4 ori mai mare de a dezvolta SDA. În sfârșit, studiile concordanței bolii la gemenii MZ și DZ au permis calcularea unei heritabilități de 21% pentru tipul I și de 60-80% pentru tipul 2, care are evident o susceptibilitate genetică mai mare.

Predispoziția la SDA se corelează cu anumite variante ale enzimelor implicate în metabolismul alcoolului (vezi capitolul 9.B.1.2) în special alcool-dehidrogenaza (ADH) și aldehid-dehidrogenaza (ALDH); unele variante au o eficiență metabolică mai redusă și pot duce la o stare toxică la consumul unor cantități mici de alcool. Studiile de tip „genă-candidat" și studiile GWAS au pus în evidență o serie de loci/gene implicate în susceptibilitatea genetică la SDA: *CHRM2* (gena pentru receptorul muscarinic M2), *GABRA2, GABRG1* (gene pentru receptorii GABA), *ADH4, OPRM1* (gena pentru receptorul opioid μ), *DRD2* (gena receptorului D2 pentru dopamină).

C. Malformațiile congenitale izolate

Anomaliile congenitale sunt modificări morfologice ale unui organ sau ale unei regiuni anatomice, produse de tulburări în dezvoltarea prenatală (erori de morfogeneză), prezente la naștere. Din punct de vedere patogenic se clasifică în malformații, disrupții, deformații și displazii congenitale (vezi capitolul 15.B). *Malformațiile congenitale* sunt produse printr-un proces primar și intrinsec de morfogeneză anormală. Pot fi *izolate* (unice) sau *multiple* (asociate cu alte anomalii congenitale).

Malformațiile congenitale izolate sunt considerate boli multifactoriale, deoarece pot avea o agregare familială, concordanța la gemenii MZ este mai mare decât la gemenii DZ, iar rudele de gradul I ale bolnavilor au un risc de recurență mai mare decât în populația generală. Cele mai frecvente malformații congenitale multifactoriale sunt menționate în tabelul 14.6, iar la unele dintre acestea ne vom referi în continuare; alte probleme legate de malformațiile congenitale sunt prezentate în capitolul 15.

Ca și în alte boli multifactoriale, *riscul empiric de recurență* al malformațiilor congenitale izolate este *specific* fiecărei boli în parte, dependent de *frecvența bolii în populație* și aproximativ egal cu rădăcina pătrată a incidenței generale în populație (vezi capitolele 6.E.2 și 10.C.5). Astfel, pentru malformațiile congenitale izolate, care au o incidență în populație de circa 1: 1.000, dacă doi părinți sănătoși, fără antecedente familiale, au un copil afectat, riscul de recurență la sarcinile următoare este de *1 la 32 sau 3%*; același risc îl au și descendenții unui bolnav. Riscul la descendenți *crește peste 5%* dacă în familie sunt *mai multe persoane afectate* sau dacă bolnavul prezintă *o formă mai gravă de boală*; în cazul în care *unul dintre sexe este mai frecvent afectat* (de exemplu, sexul masculin pentru stenoza congenitală de pilor sau sexul feminin pentru luxația de șold), riscul de recurență este mai mare după nașterea unui copil care aparține sexului mai rar afectat. Astfel, în stenoza de pilor, dacă tatăl a fost afectat, riscul de recurență este de 5,5% la băieți și de 2,4% la fete; dacă mama a fost afectată, riscul este de 19,4% pentru băieți și de 7,3% pentru fete.

În acordarea sfatului genetic trebuie să ținem cont de faptul că *în anumite malformații congenitale izolate există* și *forme rare monogenice* (de exemplu, unele cazuri de hidrocefalie pot fi recesive legate de X, autozomal dominante sau recesive) și mai ales trebuie să ne convingem – prin anamneză și evaluarea atentă și minuțioasă a pacientului – că anomalia este izolată și nu se asociază cu alte anomalii congenitale, uneori minore, într-un sindrom plurimalformativ specific (de exemplu, peste 40% dintre despicăturile palatine sunt sindromice); în această situație, etiologia este heterogenă (cromozomială, monogenică, teratogenă) și riscul de recurență este diferit de la un caz la altul.

Tabelul 14.6. Incidența la nou-născuți, heritabilitatea și riscul empiric de recurență a unor malformații congenitale izolate, multifactoriale

Tipul de malformație	Incidența (‰) la naștere	Heritabilitatea (%)	Riscul de recurență (%)
Defectele de tub neural Anencefalia Spina bifida	2-10 variabilă variabilă	60	5
Hidrocefalia	0,7	42	2-4
Malformațiile congenitale de cord Defectul septal ventricular Persistența canalului arterial Defectul septal atrial Stenoza aortică	4-8 1,7 0,5 1,0 0,5	35	1-4
Despicăturile labiale cu sau fără despicături palatine Despicături palatine	0,4-1,7 0,4	76	4 2
Stenoza pilorică	1,5-3	75	2-10*
Luxația congenitală de șold	1-5	60	2-11*
Piciorul strâmb congenital	1-3	68	3

Surse: Kingston, 2002; Nussbaum *et al.*, 2001
*Riscul de recurență depinde de sexul bolnavului și al rudei sale de gradul I

1. Defectele de tub neural

Defectele de tub neural (DTN) sunt anomalii congenitale frecvente (1-2:1.000 nou-născuți vii) produse în săptămânile 3-4 de sarcină, prin neînchiderea tubului neural[15]. Formele cele mai comune sunt anencefalia și spina bifida[16].

În **anencefalie** se produce un defect de închidere al polului anterior al tubului neural, iar encefalul, meningele, calota craniană și pielea capului sunt absente; se asociază cu anomalii faciale și auriculare secundare, cecitate și surditate. Malformația este letală, înainte sau imediat după naștere.

În **spina bifida** se produce un defect de fuziune a arcurilor vertebrale, cel mai frecvent în regiunea lombară. Există grade variate de severitate, de la *spina bifida oculta*, în care defectul interesează numai arcurile vertebrale, la *spina bifida aperta* (deschisă), în care defectul osos se asociază cu *meningocel* (protruzia meningelui) sau *meningomielocel* (hernierea măduvei spinării acoperită de meninge) (figurile 14.3, 14.4 și 14.5). Când interesează întreaga coloană vertebrală, defectul poartă numele de *rahischizis*. Formele deschise se pot asocia frecvent cu hidrocefalie, picior strâmb congenital, paralizie a membrelor inferioare și incontinență sfincteriană. Prognosticul este destul de sever: după tratamentul chirurgical, 1/3 din cazurile de spina bifida deschisă supraviețuiesc cel puțin 5 ani, dar 85% dintre acestea vor avea un handicap neurologic grav și doar 5% vor fi fără handicap.

Majoritatea cazurilor de DTN sunt multifactoriale (cu un risc de recurență de 3%), dar sunt și cazuri rare produse prin teratogeni (anticonvulsivante, antimetaboliți, toxine diverse, diabetul tip 1 matern, obezitatea și, probabil, fumatul în cursul sarcinii), prin anomalii cromozomiale (trisomia 18) sau prin anomalii monogenice pleiotrope (de exemplu, sindromul Meckel, autozomal recesiv).

În cazurile multifactoriale, determinate de factori genetici[17] și de mediu, s-a constatat că un rol major îl are *deficiența maternă de acid folic și/sau vitamina B12*: scăderea concentrației serice a acidului folic sub un prag de 200 µg/L crește semnificativ riscul de a se produce la făt un DTN. Concomitent cu reducerea nivelului sangvin de folați crește nivelul de homocisteină[18] și scade concentrația metioninei; acest fapt a sugerat existența unei anomalii biochimice în reciclarea tetrahidrofolaților și metilarea homocisteinei în metionină.

Astfel, s-a descoperit că aportul alimentar redus de acid folic are efecte mai ample la persoanele heterozigote

15. Detalii privind genetica morfogenezei tubului neural sunt prezentate în capitolul 15.A.2.2.1.
16. Alte tipuri de DTN sunt: encefalocelul, hidranencefalia, iniencefalia și schizencefalia.
17. Recent s-au descris în DTN mutații ale genelor *VANGL1* și *VANGL2* ce intervin în stabilirea polarității planare; acestea sunt un argument pentru includerea DTN în grupul mare al ciliopatiilor.
18. Același efect îl are și fumatul în cursul sarcinii.

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

Figura 14.3. Meningoencefalocel occipital
(colecția prof.dr. M. Bembea)

Figura 14.4. Meningocel fronto-nazal
(colecția prof.dr. M. Bembea)

Figura 14.5. Meningoencefalocel occipital
(colecția prof.dr. M. Bembea)

pentru mutația C677T a genei *MTHFR* (metilentetrahidrofolatreductaza) care înlocuiește alanina din poziția 222 cu o valină și determină reducerea eficienței enzimei; circa 5-10% din populație este homozigotă pentru această mutație.

Important este faptul că introducerea unei *suplimentări de 0,4mg/zi de acid folic periconcepțional* (o lună înainte de concepție și două luni după aceea)[19] scade incidența DTN cu peste 75%. Această măsură preventivă poate fi asociată (mai ales în familiile cu risc crescut de recurență, datorită altor cazuri de DTN) cu *screening*-ul ecografic al gravidelor și dozarea alfa-fetoproteinei (AFP) în sângele matern; în sarcinile în care fătul are un DTN se găsesc valori foarte crescute ale AFP. În cazurile cu test AFP pozitiv, diagnosticul se va pune prin amniocenteză și determinarea AFP și acetilcolinesterazei în lichidul amniotic (vezi capitolul 19).

2. Hidrocefalia

Hidrocefalia (1 la 500 nou-născuți vii) reprezintă acumularea excesivă de lichid cefalo-rahidian în spațiile intracraniene, asociată cu creșterea presiunii intracraniene și compresia și afectarea creierului. Se datorează unor tulburări de producere sau/și de circulație a lichidului cefalorahidian (stenoza apeductului Sylvius, obstrucția foramina interventriculare), determinate de cauze diferite (spina bifida, hemoragii intracraniene, infecții fetale sau factori genetici).

Aspectul clinic este caracteristic (figura 14.6): mărime enormă, uneori gigantă a neurocraniului, în disproporție evidentă cu dimensiunile viscerocraniului și corporale, fontanele foarte lărgite și dehiscență a oaselor craniene, privire în „apus de soare", circulație colaterală la nivelul calotei craniene, atrofie a nervului optic cu cecitate, retard psihomotor important, convulsii.

Figura 14.6. Hidrocefalie
(colecția prof.dr. M. Bembea)

Tratamentul chirurgical prin efectuarea unui șunt permanent între craniu și peritoneu sau vena cavă superioară dă rezultate bune, inteligența și comportamentul neurologic fiind normale în 80% din cazuri.

Majoritatea cazurilor de *hidrocefalie izolată* sunt determinate multifactorial, iar riscul de recurență este mic, de 2-4%. Există însă și forme monogenice de hidrocefalie – autozomal dominate sau recesive, precum și recesive legate de X[20] – care de obicei se asociază cu alte anomalii congenitale (10% din cazuri). În aceste cazuri, examenul clinic atent și anamneza familială

19. La femeile care au avut un copil cu DTN doza se va crește până la 4mg/zi de acid folic.
20. Formele de hidrocefalie legate de X – HSAS sau forma clasică, sindromul MASA și parapareza spastică complicată de tipul1 (SPG1) – sunt determinate de mutații diferite în gena *LICAM* de pe Xq28, ce codifică molecula de adeziune L1.

pot contribui decisiv la evitarea unor erori de sfat genetic.

Diagnosticul prenatal este posibil uneori prin ecografie.

3. Malformațiile congenitale de cord

Malformațiile congenitale de cord (MCC) sunt defecte în structura inimii și vaselor mari fiind produse prin disrupția secvenței complexe de evenimente morfogenetice (vezi capitolul 15.A.2) ce duc la formarea normală a inimii. MCC sunt variate ca tip de defect, manifestare clinică și gravitate. MCC sunt printre cele mai frecvente anomalii congenitale (9 la 1.000 nou-născuți), fiind o cauză majoră de morbiditate și mortalitate infantilă.

MCC reprezintă un grup eterogen de malformații, atât din punct de vedere clinic (*izolate*, *complexe* – prin asocierea a 2-3 tipuri – și *sindromice*), cât și din punct de vedere etiologic (*genetice* – cromozomiale, monogenice, *negenetice* – produse de agenți teratogeni[21] și, probabil cele mai multe, *multifactoriale*) și patogenic (cele mai numeroase MCC obstruează fluxul sângelui în inimă și/sau vasele mari sau îl dirijează într-un mod anormal).

Majoritatea cazurilor de MCC sunt izolate, sporadice și de origine multifactorială. Există totuși o agregare familială redusă, dar persoanele afectate nu au exact același tip de MCC, ci mai curând anomalii care au un mecanism de producere similar. Riscul de recurență la rudele de gradul I variază între 2 și 4% (în funcție de tipul de MCC) fiind mai mare pe orizontală (în fratrie) decât pe verticală[22]; la rudele de gradul II riscul se reduce foarte mult, la niveluri apropiate de populația generală. Diagnosticul prenatal este posibil prin ecocardiografie fetală.

Anomaliile cromozomiale mari, cum ar fi trisomiile 21, 18 și 13 sau monosomia X reprezintă circa 5-8% din MCC. Studiile recente prin FISH și rețele CGH au arătat că, probabil, la fel de numeroase sunt microdelețiile recurente 22q11, 1q21, 8p23 și multe alte microdelеții/microduplicații (mai puțin recurente) ale diferitelor regiuni genomice.

Analizele moleculare în diferite sindroame rare cu MCC au dus la identificarea unor gene mutante, unele asociate cu defecte specifice; interesant este faptul că mutațiile aceloraşi gene au fost identificate și în formele izolate, nesindromice. Un exemplu îl reprezintă mutațiile genei *MYH6* (codifică catena grea a alfa-miozinei, o proteină miocardică) care produc defect septal atrial (DSA); această genă interacționează cu factorii de transcripție GATA4 și TBX5, precum și cu proteina homeobox NKX2-5 – asociind la DSA și DSV sau în cazul genei *TBX5* producând sindromul Holt-Oram (DSA, DSV și anomalii ale degetelor). În MCC au fost identificate mutații în alte gene *TBX*, care au rol important în formarea țesuturilor și organelor, cum ar fi *TBX20* (defecte septale și/sau valvulare) și *TBX1*, implicată în sindromul velo-cardio-facial.

În MCC au mai fost identificat mutații în gene ce codifică liganzi (de exemplu, Jagged[23]) sau receptori (de exemplu, Notch2 și Notch2) ai *căii de semnalizare intercelulară Notch*, cu rol important în reglarea dezvoltării embrionare. Menționăm în final mutațiile în calea RAS/MAPK (ce transmite semnale de la receptori la ADN) care au fost identificate într-o serie de sindroame cu MCC, cum ar fi: Noonan, Costello, LEOPARD și cardio-facio-cutanat – incluse într-un grup comun de RASopatii.

4. Despicăturile labiale și despicăturile palatine

Despicăturile labiale (uni- sau bilaterale) cu sau fără despicătură palatină – DL(P) – sunt malformații congenitale frecvente, cu o incidență medie de 1 la 700 de nou-născuți. Din punct de vedere patogenic, DL(P) – produse (cam în a 35-a zi de gestație) printr-un defect de fuziune a mugurelui fronto-nazal cu mugurii maxilari – se deosebesc de despicăturile palatine (DP) fără despicături labiale, care rezultă printr-un defect de fuziune a lamelor palatine ale oaselor maxilare. Ambele tipuri, DL(P) și DP, se prezintă (sub forme complete sau parțiale) ca malformații izolate sau se pot asocia cu alte anomalii congenitale; formele izolate sunt de regulă multifactoriale, iar cele asociate (circa 2-11% dintre DLP și 20-50% dintre DP) se întâlnesc în peste 250 de sindroame monogenice (Stickler, Van der Woude, Siderius), cromozomiale (trisomia 13 și alte anomalii) sau teratogene (dieta maternă și aportul de vitamină A sau retinoizi, anticonvulsivante, alcoolul, fumatul și hipoxia maternă, nitrați, solvenți organici ș.a.). În aceste condiții, evaluarea unui copil cu DL(P) și mai ales cu DP trebuie să fie completă și minuțioasă pentru a identifica posibile asocieri cu alte

21. În producerea MCC au fost implicați următorii agenți teratogeni: rubeola, alcoolul, hidantoina, litiu precum și boli materne: DZ tipul 1, fenilcetonuria, lupusul eritematos sistemic.
22. Nu se cunosc explicațiile acestui fenomen.
23. Majoritatea cazurilor de sindrom Alagille (displazia arterio-hepatică) în care se găsesc diferite MCC (13% au tetralogie Fallot).

BCU "VICTOR BABEȘ" UNIVERSITY LIBRARY

anomalii congenitale, fapt ce ar modifica prognosticul şi sfatul genetic.

Au fost identificate o serie de mutaţii genice care pot creşte riscul apariţiei DL(P). Astfel, mutaţiile *TGFα* (factorul de creştere tumorală alfa) au fost primele asociate cu creşterea riscului pentru DL(P), dar rezultatele a numeroase studii au fost inconsistente. Se pare că aceste mutaţii au rol numai în cazurile în care există o agregare familială evidentă. Alte mutaţii genice asociate cu creşterea riscului pentru apariţia unor despicături labio-palatine, izolate sau sindromice, interesează genele *MSX1, PHF8, IRF6, BMP4* şi *PVRL1*.

Riscul de recurenţă a formelor izolate de DL(P) sau DP – considerate „prototipuri" de boli multifactoriale – creşte odată cu severitatea afectării, de la DL unilaterale (4%) la DL bilaterale (6,7%) şi de la DL la DLP (8%); de asemenea, riscul de recurenţă la rudele de gradul I creşte în paralel cu numărul persoanelor afectate în familie, de la 3-4% atunci când există un bolnav (un părinte sau un copil) la 12-14% când există doi bolnavi (un părinte şi un copil sau doi copii afectaţi). În toate aceste cazuri izolate, riscurile sunt „acceptabile", având în vedere mărimea, rezultatele foarte bune ale corecţiilor chirurgicale şi posibilităţile de diagnostic prenatal, prin ecografie.

5. Alte anomalii congenitale izolate

a. Stenoza hipertrofică pilorică infantilă

Stenoza pilorică a reprezentat pentru Carter (1960) modelul folosit pentru elaborarea conceptului de boală poligenică, multifactorială. Incidenţa medie în populaţia europeană este de 2-4 la 1.000 nou-născuţi vii, de 4-5 ori mai frecventă la sexul masculin decât la cel feminin. Riscul de recurenţă depinde de sexul probandului, fiind mai mare atunci când sunt afectate persoane de sex feminin (tabelul 14.7). Unele variante alelice ale genei *NOS1* (care codifică oxidaza nitrică neuronală) par a creşte riscul pentru apariţia hipertrofiei pilorice izolate.

b. Luxaţia congenitală de şold

Luxaţia congenitală de şold (LCS) reprezintă deplasarea capului femural în afara acetabulei, produsă înaintea sau în timpul naşterii. LCS este o formă clinică a „displaziilor de dezvoltare a şoldului", care includ displazia acetabulară, subluxaţia şi luxaţia congenitală a capului femural în afara cotilei (acetabulum). LCS are o incidenţă de 4-7:1.000 de nou-născuţi vii pentru formele temporare, instabile (subluxaţii) şi de 1:1.000 pentru luxaţiile propriu-zise. Raportul între sexe este de 8F:1M. Anomalia este identificată la naştere, prin manevrele Ortolani sau Barlow şi poate fi tratată uşor prin tratament postural.

Tabel 14.7. Riscul genetic în familiile cu stenoză pilorică

(după Carter, 1983)

Risc (%)	Cazul index	
	Sex masculin	Sex feminin
Rude de gradul I		
Fraţi	6,5	10,8
Surori	2,8	3,8
Fii	5,5	18,9
Fiice	2,4	7,0
Rude de gradul II		
De sex masculin	2,2	0,5
De sex feminin	4,3	1,7
Populaţia generală	0,5	0,1

LCS este o anomalie congenitală cu determinism multifactorial; factorii genetici controlează conformaţia acetabulei şi laxitatea articulară. Alţi factori de risc sunt poziţia intrauterină şi prezentaţia pelvină, primiparitatea şi, desigur, sexul fătului (se crede că producţia de estronă de către ovarul fetal şi relaxina produsă de către uterul fetal produc o creştere a laxităţii articulare).

Riscul de recurenţă în fratrie este, în medie, de 5%, fiind puţin mai mare dacă probandul este de sex masculin.

c. Piciorul strâmb congenital

Piciorul strâmb congenital (PSC) este o deformaţie congenitală, posturală sau structurală, relativ frecventă (1 la 1.000 de nou-născuţi, de două ori mai frecventă la fete decât la băieţi). PSC poate fi o anomalie izolată (formele posturale) sau o componentă a mai multor sindroame cu afectare nervoasă sau a ţesutului conjunctiv (în formele structurale). În formele izolate determinismul este cel mai probabil multifactorial, deoarece studiile genetice relevă o agregare familială; în unele cazuri/familii se observă o segregare mendeliană. Studiile mai vechi şi-au pierdut din valabilitate, deoarece astăzi se ştie cu certitudine că sub denumirea de PSC sunt incluse trei entităţi diferite: piciorul equinovarus (abducţia şi flexia plantară a labei piciorului), piciorul calcaneovalgus (flexia dorsală a labei piciorului; suprafaţa plantară priveşte lateral) şi metatarsus varus (adducţia şi inversia labei piciorului). În practica sfatului genetic se folosesc încă riscurile empirice – de 1:50 pentru probandul de sex masculin şi de 1:20 pentru probandul de sex feminin; pentru un părinte afectat (de orice sex) riscul la urmaşi este de 1:33.

D. Autismul şi retardul mental

1. Autismul

Autismul cuprinde un grup eterogen de boli ale dezvoltării neurale caracterizat prin trei elemente majore (triada autistă), ce debutează de regulă înaintea vârstei de trei ani: tulburări de comunicare verbală şi nonverbală; tulburări ale relaţiilor sociale (interacţiuni sociale reciproce); interes limitat şi/sau conduite repetitive, stereoptipe. La acestea se adaugă variabil şi alte manifestări nespecifice: fobii, perturbări ale somnului şi alimentaţiei, crize de furie şi gesturi auto-agresive. Boala nu are încă un tratament şi adulţii nu vor fi capabili de viaţă independentă.

Autismul tipic/clasic (numit şi autismul infantil precoce de tip Kanner) reprezintă una din cele cinci afecţiuni incluse în *„spectrul autistic*[24]", alături de sindromul Asperger, sindromul Rett, sindromul de dezintegrare al copilăriei şi autismul atipic/nespecific.

Prevalenţa medie a bolii este de circa 1/500 persoane, fiind de patru ori mai frecventă la băieţi comparativ cu fetele. Frecvenţa bolii a crescut în ultimele 2-3 decenii, dar explicaţia acestui fenomen nu este clară: unii specialişti consideră că este un artefact determinat de o mai bună diagnosticare, alţii cred că este vorba de o creştere reală datorită unei componente autoimune.

Etiopatogenia bolii este încă neelucidată. În autism este afectată procesarea informaţiilor în creier, prin alterarea organizării[25] şi conexiunilor neuronale (disfuncţii sinaptice), produsă prin interacţiunea unor factori multipli genetici, de mediu şi, probabil, epigenetici. Autismul este deci o boală complexă, multifactorială, care deşi debutează la copil este prezentă, firesc, şi în patologia adultului.

Rolul factorilor genetici este important, fiind demonstrat de agregarea familială a unor cazuri (deşi predomină cazurile sporadice), concordanţa mare (peste 75%) la gemenii monozigoţi şi riscul recurenţei bolii în fratrie de 25 de ori mai mare decât în populaţia generală. Heritabilitatea a fost calculată la 70% pentru autism şi 90% pentru spectrul autistic. Totuşi, studiile clasice au identificat diferite cauze genetice doar la 20-25% dintre bolnavii cu autism; un număr mic de cazuri erau corelate cu expuneri teratogene[26] (infecţii cu virusul rubeolic sau citomegalic; metale grele, solvenţi, pesticide etc.) şi la circa 75% dintre bolnavi cauzele erau necunoscute. Studiile recente, bazate pe tehnici moleculare, au furnizat date noi şi au condus la reevaluarea procentului determinat de cauze genetice la circa 40%.

- Au fost descrise anomalii cromozomiale vizibile prin tehnicile de înaltă rezoluţie (prometafază), la ~5% bolnavi, (de exemplu, duplicaţia regiunii 15q11-13) şi microdeleţii/microduplicaţii evidenţiate prin tehnicile FISH, MLPA sau reţele CGH – la ~10% bolnavi (de exemplu, microdeleţia/microduplicaţia 16p11.2 sau microdeleţiile 2q37, 7q22-31, 22q11-13.3, Xp22.3).
- Există numeroase sindroame monogenice cu autism (prezente la 10-15% din cazuri): X fragil, Rett, Sotos, Angelman, DeLange, Smith-Lemli-Opitz, velo-cardio-facial, scleroza tuberoasă ş.a. precum şi tulburări metabolice asociate cu autism (tulburări în metabolismul purinelor, pririmidinelor, GABA, creatininei, glutamatului etc.). Studiul lor este important clinic pentru evaluarea copiilor cu autism precum şi patogenic deoarece a permis identificarea unor gene implicate în mecanismele de boală.
- Studiul variaţiilor numărului de copii (CNV) au evidenţiat (~10% bolnavi) deleţii sau duplicaţii ale unor regiuni genomice (16p11.2; 15q13.3; 2p16; 11p12 ş.a.) ce includ gene implicate în patogenia bolii.

Majoritatea genelor identificate în autism codifică molecule de adeziune ale celulelor neuronale şi/sau de funcţionare a sinapselor (canale ionice, receptori, neurotransmiţători), factori de transcripţie şi proteine implicate în dezvoltarea creierului/migrarea neuronală; citäm câteva dintre aceste gene pentru care sunt şi teste disponibile, menţionând în paranteză proteina codificată: *NRXN1* (neurexină), *NLGN* (neuroligină), *MECP2* (proteina de fixare pe metil CpG), *PTEN* (omolog al fosfatazei şi tensinei). Mutaţiile unora dintre aceste gene produc sindroame monogenice, dar variante alelice de risc au fost descrise în cazuri sporadice, cu determinism multifactorial. Cert este că la momentul actual nu se poate defini o patogenie coerentă a autismului, care să permită apoi identificarea unor ţinte terapeutice.

2. Retardul mental

Retardul mental (RM) este definit ca o imposibilitate de a dobândi capacităţile cognitive (IQ sub 70) şi adaptative corespunzătoare vârstei. Prevalenţa RM este de circa 2-3%. De fapt, sub denumirea de RM sunt cuprinse numeroase boli cu etiologie diferită care produc oprirea dezvoltării mintale sau o dezvoltare mintală incompletă, inteligenţa fiind afectată în ansamblul ei. Asupra acestui subiect ne vom referi

24. Termen introdus în 2009 de Asociaţia Autism Europa.
25. În autism s-au descris recent anomalii ale citoarhitecturii sistemului limbic şi cerebelului ce traduc probabil un defect genetic de maturare.
26. Teoria vaccinală (ce implica fie o supradoză, fie substanţele de prezervare) s-a dovedit recent a fi o fraudă ştiinţifică.

în detaliu în capitolul 16; deoarece inteligența este un caracter poligenic, este firesc ca majoritatea cazurilor de RM ușor (IQ = 50-70) *nespecific* să aibă un *determinism multifactorial*; în formele moderate de RM (IQ sub 50) cauzele specifice (deseori genetice) sunt mult mai frecvente.

Coeficientul de inteligență al urmașilor este probabil în jurul mediei parentale. De aceea, dacă unul sau ambii părinți au un *RM ușor*, riscul unor copii cu RM este mai mare. Riscul de recurență depinde de diagnostic, dar în RM nespecific (fără o cauză identificată) este de circa 3% pentru rudele de gradul I. Riscul de recurență crește însă după nașterea a doi copii cu RM (25%), când părinții sunt consangvini (15%) sau probandul este de sex masculin (4-5%) (unele cazuri ar putea fi RMLX).

Bibliografie specifică selectivă

1. Aitman TJ. *Genetic medicine and obesity.* N Engl J Med 2003; 348(21):2138-2139.
2. Binder A. *A review of the genetics of essential hypertension.* Curr Opin Cardiol 2007; 22:176-184.
3. Barnes K. *Genetics of asthma.* www.uptodate.com.
4. Billings LK, Florez JC. *The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS?* Ann N Y Acad Sci 2010; 1212:59-77.
5. Bird TD. *Genetic aspects of Alzheimer disease.* Gen Med 2008; 10:231-239.
6. Bonnefond A, Froguel P, Vaxillaire M. *The emerging genetics of type 2 diabetes.* Trends Mol Med 2010; 16:407-416.
7. Blumenthal JB, Blumenthal MN. *Genetics of asthma.* Med Clin North Am 2002; 86:937-950.
8. Cambien F, Tiret L. *Génétique et pathologie coronarienne.* În Feingold J, Fellous M, Solignac M (ed.). *Principes de génétique humaine.* Herman, Paris, 1998, 359-374.
9. Cheța D. *Genetics of Diabetes – the truth unveiled.* Editura Academiei Române, Karger, București, Basel, 2010.
10. Concannon P, Rich S, Nepom GT. *Genetics of Type 1A Diabetes.* N Engl J Med 2009; 360:1646-1654.
11. Dick DM, Foroud T, Flury L, Bowman ES, Miller MJ *et al. Genomewide Linkage Analyses of Bipolar Disorder: A New Sample of 250 Pedigrees from the National Institute of Mental Health Genetics Initiative.* Am J Hum Genet 2003; 73(1):107-114.
12. Ehret GB. *Genome-wide association studies: contribution of genomics to understanding blood pressure and essential hypertension.* Curr Hypertens Rep 2010; 12:17-25.
13. Farrogi SI, O'Rahilly S. *Genetics of obesity in human.* Endocr Rev 2006; 27:710-718.
14. Florez JC. *The Genetics of Type 2 Diabetes: A Realistic Appraisal in 2008.* J Clin Endocrinol Metab 2008; 93:4633-4642.
15. Franceschini N, Reiner AP, Heiss G. *Recent findings in the genetics of blood presure and hypertension traits.* Am J Hypert 2010; doi:101038/ajh 2010.218.
16. Gambaro G, Anglani F, D'Angelo A. *Association studies of genetic polymorphisms and complex disease.* Lancet 2000; 355:308-311.
17. Gelernter J, Kranzler HR. *Genetics of alcohol dependence.* Hum Genet 2009; 126:91-99.
18. Hardy J, Singleton A. *Gnomewide association studies and human disease.* N Engl J Med 2009; 360:1759-1768.
19. Harrison PJ, Owen MJ. *Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications.* Lancet 2003; 361(9355):417-419.
20. Heilig M, Thorsell A. *Brain neuropeptide Y (NPY) in stress and alcohol dependence.* Rev Neurosci 2002; 13:85-94.
21. Hopkins PN, Hunt SC. *Genetic of hypertension.* Genet Med 2003; 22:413-429.
22. Humma LM, Terra SG. *Pharmacogenetics and cardiovascular disease impact on drug response and applications to disease management.* Am J Health Syst Pharm 2002; 59:1241-1252.
23. Jankovic J. *Etiology and pathogenesis of Parkinson disease.* www.uptodate.com.
24. Kibar Z, Torban E, McDearmil JR *et al. Mutations in VANGL1 associated with neural tube defect.* N Enl J Med 2007; 356:1432-1439.
25. Kinney DK. *Schizophrenia.* În *Emery and Rimoin's Principles and practice of Medical genetics.* ed. a III-a. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1827-1840.
26. Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH *et al. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group.* N Engl J Med 1998; 338:86-93.
27. Manolio TA. *Genomewide association studies and assessment of the risck of disease.* N Engl J Med 2010; 363:166-176.
28. March ME, Sleiman PM, Hakonarson H. *The genetics of asthma and allergic disorders.* Discov Med 2011; 11(56): 35-45.
29. McCarthy MI. *Genomics, type 2 diabetes and obesity.* N Engl J Med 2010; 363:2339-2350.
30. McInnis MG, DePaulo JR. *Major mood disorders. Emery and Rimoin's Principles and practice of Medical genetics.* ed. a III-a. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1843-1849.
31. McInnes RR, Micheaud JL. *Genetics factors in congenital heart malformations.* Clin Genet 2008; 73:516-527.
32. McPherson R. *Chromosome 9p21 and coronary artery disease.* N Engl J Med 2010; 362:1736-1737.

BCU "VICTOR BABEȘ" UNIVERSITY LIBRARY

33. Nurneberger J, Bierut LJ. *Seeking the connections: alcoholism and our genes*. Scientific American 2007; 296: 456-458.
34. O'Donovan MC, Craddock NJ, Owen HJ. *Genetics of psychosis; insight from view across genome*. Hum Genet 2009; 19:1007/s 00439-009-0703-0.
35. Owen MJ, Williams HJ, O'Donovan MC. *Schizofrenia genetics: advancing on two front*. Curr Opin Genet Develop 2009; 19:266-270.
36. Pankratz N, Foroud T. *Genetics of Parkinson disease*. Genet Med 2007; 9:801-809.
37. Querfurth HW, LeFerlo FM. *Alzheimer's disease*. New E J Med 2010; 362:329-342.
38. Robinson SW, Morris CD, Goldmuntz E, Reller MD, Jones MA, Steiner RD, Maslen CL. *Missense mutations in CRELD1 are associated with cardiac atrioventricular septal defects*. Am J Hum Genet 2003; 72:1047-1052.
39. Shaefer GB, Mendelson NJ. *Genetics evaluation for the etiologic diagnosis of autism spectrum disorders*. Genet Med 2008; 10:4-12.
40. Sleiman PMA, Hakonaeson H. *Recent advances in the genetics and genomics of asthma and related traits*. Curr Opin Ped 2010; 22:307-312.
41. Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T *et al. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia*. Am J Hum Genet 2002; 71(4):877-892.
42. Thomas B, Beal FM. *Parkinson's disease*. Hum Molec Genet 2007; 16:R183-194.
43. Tidyman WE, Rauen KA. *The RASopathies: developmental syndromes of RAS/MAPK pathway dysregulation*. Curr Opin Genet Develop 2009; 19:230-251.
44. Weiss LA, Shen Y, Korn MJ *et al. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism*. N Engl J Med 2008; 358:667-675.
45. Winkelmann BR, Hager J, Kraus WE *et al. Genetics of coronary heart disease: current knowledge and research principles*. Am Heart J 2000; 140:S11-26.
46. Wiebolt J, Koeleman BP, van Haeften TW. *Endocrine autoimmune disease: genetics become complex*. Eur J Clin Invest 2010; 40:1144-1155.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 15

GENETICA DEZVOLTĂRII ŞI ANOMALIILE CONGENITALE

Anomaliile congenitale (AC) reprezintă o problemă majoră de sănătate publică prin frecvenţa lor ridicată, de 3-5% dintre nou-născuţi şi prin morbiditatea şi mortalitatea infantilă pe care o produc. Pentru medici, AC pun deseori probleme dificile de diagnostic, mai ales atunci când sunt multiple şi se înscriu în unul dintre cele peste 2.000 de sindroame plurimalformative. Pentru părinţi, problemele esenţiale sunt îngrijirea şi recuperarea copiilor afectaţi sau/şi prevenirea/reducerea riscului recurenţei malformaţiilor la o nouă sarcină. Pentru societate, profilaxia anomaliilor congenitale şi reducerea consecinţelor malformative este, evident, un obiectiv major.

Etiologia anomaliilor congenitale este în mare parte necunoscută, dar se estimează că o bună parte dintre anomalii sunt determinate de *mutaţii ale unor gene implicate în controlul proceselor de dezvoltare*. De aceea, caracterizarea acestor gene a început să producă o profundă schimbare în înţelegerea bazelor moleculare ale anomaliilor congenitale. Ca urmare, acest capitol va începe printr-o introducere în procesele ce coordonează dezvoltarea şi va continua cu o discuţie referitoare la perturbările acestor procese, care au ca rezultat apariţia anomaliilor congenitale.

A. Genetica dezvoltării

Procesul de dezvoltare poate fi definit ca fiind ansamblul mecanismelor prin care, pornind de la zigot, se ajunge la un organism matur, capabil de reproducere. Toate evenimentele din cursul dezvoltării – formarea diferitelor tipuri de celule, formarea organelor şi aranjarea spaţială, caracteristică, a acestora – se desfăşoară conform unui *plan de dezvoltare*, ale cărui instrucţiuni sunt codificate în materialul genetic. O definiţie mai largă a dezvoltării ontogenetice include toate *procesele care au loc între momentul fecundării şi decesul individului*.

Din motive etice şi tehnice, studierea evenimentelor care se produc în cursul dezvoltării embrionare la om întâmpină mari dificultăţi. Ca urmare, au fost utilizate o serie de modele experimentale pe animale, care au permis obţinerea unor informaţii, ce pot fi extrapolate în mare măsură la om. Acest lucru este posibil, deoarece cele mai multe dintre genele şi căile implicate în procesele de dezvoltare prezintă un grad foarte înalt de conservare, în evoluţia mamiferelor.

1. Categorii de gene implicate în controlul dezvoltării

Genele implicate în dezvoltarea embrionară codifică diverse componente ale unor *căi de semnalizare intercelulară*, precum factorii de transcripţie, moleculele de semnalizare şi receptorii acestora, componentele matricei extracelulare etc. Se cunosc şapte *căi de semnalizare* majore implicate în procesele de dezvoltare: calea de semnalizare *wingless* (Wnt), calea *TGF-β* (factorul de creştere transformant – beta), calea de semnalizare *Hedgehog* (Hh), calea *RTK* (receptorul tirozin-kinazic), calea *JAK/STAT* (Janus kinza/transductor al semnalului şi activator al transcripţiei), calea *Notch* şi calea *receptorilor nucleari*. Aceste căi sunt implicate în mai multe procese din cursul dezvoltării embrionare, iar acest lucru explică asocierea frecventă a mai multor anomalii congenitale ca urmare a mutaţiei unei gene unice.

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.1. *Gene care codifică moleculele de semnalizare paracrină şi receptorii acestora*

Interacţiunile dintre celulele vecine sunt mediate adeseori de molecule mici, capabile să difuzeze pe distanţe scurte şi să inducă un răspuns (*semnalizare paracrină*). Se cunosc patru familii majore de molecule de semnalizare paracrină: familia *FGF* (factorii de creştere fibroblastică), familia *Hedgehog* (Hh), familia *Wingless* (Wnt) şi familia factorului de creştere transformant (TGF-β) – toate având un rol important în controlul dezvoltării embrionare.

- **Factorii de creştere fibroblastică** (FGF) sunt glicoproteine cu omologie înaltă, care participă la realizarea unor procese biologice diverse: *multiplicarea, diferenţierea şi migrarea celulară*. Există 22 FGF şi 4 receptori (FGFR) care sunt intens exprimaţi în cursul dezvoltării mezodermului, stabilirea axei anteroposterioare, dezvoltarea tubului neural şi a membrelor; mutaţiile FGFR determină o serie de boli autozomal dominante, caracterizate prin displazie osoasă (vezi caseta 15.6).
- Primul membru al **familiei *Hedgehog*** a fost izolat la un mutant de la *Drosophila* care prezenta ţepi într-o zonă care este în mod normal netedă (de aceea, a fost denumit *hedgehog* – arici). La vertebrate există câţiva omologi ai genei *hedgehog*, cel mai important fiind *Sonic hedgehog* (*Shh*). *Shh* participă la specificarea axelor embrionare (vezi mai jos), la inducţia plăcii neurale şi la modelarea membrelor. Mutaţii ale Shh determină la om *holoprozencefalia* (vezi caseta 15.1). Unul dintre *receptorii Shh* este o proteină transmembranară codificată de o genă numită *patched*. Legarea *Shh* la receptorul *patched* produce supresia transcripţiei genelor care codifică membri ai familiilor *Wnt* şi *TGF-β*, determinând inhibarea creşterii celulare. Mutaţiile omologului uman, gena *PTC*, determină *sindromul Gorlin*, caracterizat prin anomalii ale coastelor, chisturi maxilare şi dezvoltarea de carcinoame cutanate bazocelulare.
- **Familia genelor *Wnt*** este denumită astfel după gena *wingless* de la *Drosophila* şi unul dintre omologii săi la vertebrate: gena *integrated*. Gena *wingless* este implicată în stabilirea polarităţii în cursul formării membrelor la *Drosophila*, iar echivalenţii săi la vertebrate joacă roluri similare. Membrii familiei *Wnt* (cel puţin 16 gene *Wnt* la om) codifică glicoproteine secretate care participă la o gamă amplă de procese ale dezvoltării, precum specificarea axei dorso-ventrale (*Wnt3*), formarea creierului, a muşchilor, a gonadelor (*Wnt4*), a cordului (*Wnt11*), scheletului (*Wnt14*) şi a rinichilor.
- **Superfamilia genelor *TGF-β*** este alcătuită dintr-un grup larg de gene înrudite structural, care codifică proteine ce formează homo- sau heterodimeri. Membri ai acestei superfamilii sunt familia *TGF*-β, familia *proteinelor morfogenetice osoase* (BMP) şi familia *activinelor*. Ele intervin în numeroase procese ale dezvoltării, precum specificarea axelor (BMP4), dezvoltarea scheletului etc. Un exemplu îl constituie proteina morfogenetică, derivată din cartilagii (CDMP1), ale cărei mutaţii produc diverse anomalii scheletice. De remarcat faptul că mutaţii diferite ale aceleiaşi gene pot determina boli diferite (heterogenitate alelică). De exemplu, o mutaţie cu sens greşit este responsabilă de producerea *brahidactiliei* (degete scurte) transmisă autozomal dominant. Indivizii care sunt homozigoţi pentru o duplicaţie de 22 pb în aceeaşi genă asociază brahidactilia cu scurtarea oaselor lungi ale membrelor (*displazia acromesomelică* – boală transmisă autozomal recesiv). În sfârşit, o mutaţie cu sens greşit care are efect dominant negativ determină în stare homozigotă *condrodisplazia Grebe*, boală autozomal recesivă caracterizată prin scurtarea severă a oaselor lungi şi a degetelor.

1.2. *Gene care codifică proteine ale matricei extracelulare*

Proteinele matricei extracelulare sunt macromolecule secretate care îndeplinesc un rol major în organizarea tuturor ţesuturilor şi organelor. Tipurile de proteine ale matricei extracelulare au fost prezentate în capitolul 12. Aceste proteine nu sunt însă doar simple elemente de structură, ci pot media şi o serie de procese extrem de importante în cursul dezvoltării, precum *migrarea celulară*. Aşa se explică faptul că mutaţii ale unor gene care codifică asemenea proteine pot determina boli caracterizate prin apariţia unor defecte de dezvoltare. Exemple sunt *sindromul Marfan*, produs prin mutaţii ale genei pentru fibrilina 1, sau *stenoza aortică supravalvulară*, produsă prin mutaţii ale genei ce codifică elastina.

1.3. *Gene care codifică factori de transcripţie*

Factorii de transcripţie sunt ultima verigă din căile de semnalizare intracelulară care intervin în controlul dezvoltării. Aşa sunt factorii de transcripţie din *familia GLI* (calea de semnalizare *Hedgehog*) sau factorii de semnalizare *TCF* (calea de semnalizare *Wingless*). Există numeroase familii de factori de transcripţie care îndeplinesc roluri majore în controlul dezvoltării, mutaţiile lor determinând anomalii congenitale diverse (vezi bolile produse prin mutaţii ale unor factori de transcripţie – tabelul 12.5).

Exemple de gene care codifică factori de transcripţie cu rol major în controlul dezvoltării sunt:

- genele homeobox, precum *familiile HOX* (39 de gene la om), au un rol major în specificarea axei antero-posterioare a embrionului; ele vor fi discutate pe larg mai jos;
- *PAX* (9 gene), au rol major în dezvoltarea unor organe (de exemplu, gena *PAX6* intervine în dezvoltarea ochiului, dar şi a pancreasului endocrin);

CASETA 15.1

Holoprozencefalia şi mutaţiile *shh*

Definiţie şi frecvenţă: *holoprozencefalia reprezintă un spectru de anomalii congenitale caracterizate prin tulburări ale dezvoltării creierului anterior şi ale etajului mijlociu al feţei. Este cea mai frecventă tulburare de dezvoltare a creierului, având o incidenţă de 1 la 10.000 până la 1 la 20.000 de nou-născuţi. Boala este de două ori mai frecventă la sexul feminin.*

Manifestări clinice: *semnele clinice cardinale ale holoprozencefaliei sunt despicătura labială şi palatină, hipotelorismul (distanţa interoculară redusă) şi absenţa separării lobilor frontali. Severitatea manifestărilor clinice este însă extrem de variată, de la forme uşoare, caracterizate doar prin prezenţa unui incisiv central superior unic sau absenţa parţială a corpului calos, până la forme severe cu ciclopie (ochi unic pe linia mediană), nas cu narină unică (proboscis), absenţă completă a fisurii intercerebrale şi microcefalie. Retardul mental este prezent la aproape toţi pacienţii şi este corelat cu severitatea malformaţiilor SNC.*

Etiologie: *holoprozencefalia este determinată de cauze multiple, de la anomalii cromozomiale (25-50% dintre cazuri) la mutaţii monogenice şi factori de mediu, precum diabetul matern. Boala poate apărea izolat sau în cadrul unor sindroame diverse precum sindromul Smith-Lemli-Opitz. Formele nonsindromice de boală pot fi transmise autozomal dominant sau recesiv ori legat de X. Mutaţiile SHH, genă localizată pe cromozomul 7q36 au fost primele identificate drept cauză genetică a holoprozencefaliei. Ele sunt responsabile pentru aproximativ 30-40% dintre formele nonsindromice familiale, transmise autozomal dominant, dar pe ansamblu explică sub 5% din cazurile de holoprozencefalie. Alte gene implicate în etiologia bolii sunt: TGIF1, ZIC2, SIX3, GLI2, PTCH1 şi HPE8.*

Patogenie şi aspecte genetice: *Shh codifică o proteină secretată la nivelul notocordului şi al planşeului plăcii neurale, determinând un gradient de concentraţie ce dirijează dezvoltarea şi organizarea diferitelor tipuri de celule şi ţesuturi la nivelul creierului şi al măduvei spinării. Shh este produsă de asemenea la nivelul unui mic grup de celule ale mugurilor membrelor, realizând aşa-numita zonă de activitate de polarizare, care este responsabilă de dezvoltarea asimetrică a degetelor. Mutaţiile Shh – ce determină holoprozencefalia – sunt mutaţii cu pierderea funcţiei. Transmiterea dominantă a bolii demonstrează haploinsuficienţa, ce reflectă probabil alterarea magnitudinii gradientului de concentraţie a proteinei, caracteristică cheie în funcţionarea sa. Expresivitatea variabilă a bolii este explicată în parte de implicarea unor mutaţii diverse ale genei, dar asemenea diferenţe fenotipice pot fi întâlnite şi în cadrul aceleiaşi familii, ceea ce presupune intervenţia unor gene modificatoare sau a unor factori de mediu.*

Sfat genetic şi diagnostic prenatal: *riscul mamelor diabetice de a da naştere unui copil cu holoprozencefalie este de 1%. În cazul formelor asociate unor anomalii cromozomiale, riscul de recurenţă depinde de prezenţa acelei anomalii la unul dintre părinţi şi de tipul particular al anomaliei citogenetice. În formele dominante de boală penetranţa mutaţiei este de aproximativ 70%. Trebuie insistat pe un examen clinic detaliat al părinţilor, care pot prezenta forme subtile de boală, precum un incisiv central superior unic sau absenţa frenulei. În formele fără istoric familial sau anomalii citogenetice asociate, riscul empiric de recurenţă este de 4-5%. Testarea genetică pentru analiza mutaţiilor genelor enumerate mai sus este disponibilă în prezent în practica clinică. Formele severe de boală pot fi detectate prin ultrasonografie la 16-18 săptămâni de sarcină.*

- *EMX* (2 gene) sunt importante în dezvoltarea creierului (mutaţiile *EMX1* determină *schizencefalie*);
- *MSX* (2 gene) implicate în dezvoltarea scheletului;
- genele cu casetă *HMG* (*high mobility group*) precum familia genelor *SOX* (20 de gene) şi genele cu casetă T, precum familia genelor *TBX* (17 gene la om); genele *TBX* au rol major în dezvoltarea axei antero-posterioare a embrionului.

Domeniul HMG al proteinelor SOX pare să activeze transcripţia indirect, prin facilitarea contactului altor factori de transcripţie cu regiunea promotor a genelor-ţintă. Genele SOX acţionează în diverse căi ale dezvoltării. Astfel, gena *SOX9* este exprimată în creasta genitală la ambele sexe, dar este hiperexprimată la sexul masculin şi inhibată la sexul feminin înainte de debutul diferenţierii gonadelor. *SOX9* reglează de asemenea condrogeneza, controlând expresia genei pentru colagen – *COL2A1*. Mutaţiile *SOX9* determină o boală numita *displazia campomelică*, caracterizată prin defecte scheletice şi inversiune sexuală (femei XY). Mutaţiile într-o genă înrudită, *SOX10*, determină *sindromul Waardenburg-Shah*, caracterizat prin boală Hirschsprung (hipomotilitatea colonului cu megacolon congenital, datorită reducerii numărului celulelor nervoase enterice), tulburări de pigmentare şi surditate.

2. Procese majore în cadrul dezvoltării embrionare

Din punct de vedere temporal se pot deosebi două perioade majore în cadrul dezvoltării embrionare:

- *Etapa embrionară precoce* se întinde între momentul *fertilizării* şi *gastrulaţie*; se caracterizează prin dobândirea aspectului trilamelar al embrionului (ectoderm, endoderm şi mezodem). Această etapă este dominată de procesele de *diferenţiere celulară precoce*, precum şi de *specificarea axelor*, ambele procese având un rol major în dezvoltarea planului organismului.
- *Etapa embrionară tardivă* este marcată de interacţiunile dintre programele specifice ale diferitelor tipuri celulare, care vor avea ca rezultat procese morfogenetice intense de *organogeneză*. De asemenea, continuă procesele de diferenţiere celulară ce vor conduce la formarea celulelor de tip adult.

2.1. Etapa embrionară precoce – dezvoltarea planului organismului

2.1.1. Evenimente majore în cursul dezvoltării embrionare precoce

a). Fertilizarea

Fertilizarea este procesul prin care doi gameţi fuzionează şi formează un nou individ. La om, gametul feminin (*ovocitul*) este o celulă foarte mare (120 μm) ce conţine materialul necesar iniţierii creşterii şi dezvoltării embrionare. Citoplasma ovocitului conţine un număr crescut de mitocondrii şi ribozomi, alături de cantităţi crescute de proteine şi ARN. La exteriorul ovocitului de află o matrice extracelulară groasă numită *zona pelucida* (ce conţine trei glicoproteine majore: ZP-1, ZP-2 şi ZP-3). Spre deosebire de ovocit, gametul masculin (*spermatozoidul*) este o celulă mică, capul acestuia având diametrul de doar 5 μm. Nucleul spermatozoidului este puternic condensat şi inactiv transcripţional, histonele fiind înlocuite cu o categorie specială de proteine de împachetare numite *protamine*. În porţiunea frontală a capului spermatozoidului se află *vezicula acrozomală*, care este dotată cu enzime ce permit penetrarea zonei pelucida. Fertilizarea declanşează secreţia de către ovocit a unor granule corticale ce împiedică penetrarea zonei pelucida de către alţi spermatozoizi. Imediat după fertilizare cromozomii celor doi gameţi rămân iniţial separaţi, formând *pronucleii* masculin şi feminin. Ulterior, aceştia fuzionează şi formează nucleul diploid al *zigotului*.

b). Dezvoltarea embrionară preimplantatorie

Odată cu prima diviziune a zigotului are loc *activarea genomului embrionar* care va conduce la sinteza de proteine necesare pentru diviziunile ulterioare de clivare. Din momentul primei diviziuni a zigotului şi până în stadiul de **morulă** celulele sunt numite *blastomere*.

> Procesul de clivare al blastomerelor este foarte complex. Primele diviziuni celulare sunt însoţite de un proces de *compactare* al celulelor. Acest proces induce un grad de polarizare a celulelor. Înainte de compactare blastomerele sunt rotunde, prezintă microvili pe întreaga lor suprafaţă celulară, iar caderina E (moleculă de adeziune intercelulară) este prezentă în zonele de contact dintre acestea. După compactare, microvilii sunt prezenţi doar la nivelul suprafeţei apicale, caderina E este distribuită la nivelul suprafeţei bazocelulare, celulele formează joncţiuni strânse cu celulele vecine, iar citoscheletul este organizat sub forma unei benzi apicale. Ca urmare, în stadiul de morulă cu 16 celule este posibilă distincţia între două tipuri celulare: *celulele externe*, polarizate şi *celulele interne*, nepolare.

La mamifere numai o mică parte din celulele embrionului precoce vor forma organismul adult deoarece o mare parte dintre acestea vor forma membranelor extraembrionare – ţesuturi care acţionează ca suport pentru susţinerea vieţii, dar nu contribuie la formarea organismului adult (vezi caseta 15.2).

În stadiul de morulă cu 32 celule, în interiorul acesteia se acumulează un lichid care conduce la formarea *blastocelului*. Totodată, celulele nepolare interne se conglomerează la un capăt al blastocelului şi formează *masa celulară internă* din care se vor dezvolta embrionul şi anexele sale (*sacul vitelin*, *alantoida* şi *amniosul*). În schimb, celulele externe vor da naştere *celulelor trofoblastice* care vor forma *corionul*, porţiunea embrionară a placentei. Până în acest moment al dezvoltării embrionare porţiuni semnificative ale embrionului pot fi îndepărtate fără ca dezvoltarea normală să-i fie afectată. De exemplu, separarea unui blastocist în două părţi egale poate conduce la dezvoltarea unor *gemeni monozigoţi* (vezi caseta 15.3). Mai mult, un embrion normal se poate dezvolta chiar dintr-o singură celulă a masei celulare interne. Această capacitate de suplinire a unor regiuni ce sunt alterate sau îndepărtate este denumită **dezvoltare reglabilă**. Acest fenomen are consecinţe importante pentru reproducerea umană, întrucât permite îndepărtarea fără consecinţe a unor celule pentru *diagnosticul preimplantator* (vezi capitolele 19 şi 21) şi protejează embrionii împotriva acţiunii teratogenilor în cursul primelor două săptămâni după concepţie (răspuns de tipul „*totul sau nimic*").

CASETA 15.2

Membranele extraembrionare şi placenta

Dezvoltarea precoce a mamiferelor este diferită de cea a altor animale prin aceea că o mare parte din programul de dezvoltare este dedicat dezvoltării unor ţesuturi care nu contribuie la formarea organismului adult. Acestea sunt cele patru membrane extraembrionare: sacul galben (yolk sack), amniosul, corionul şi alantoida. Corionul se combină cu ţesutul matern şi formează placenta. Pe lângă protecţia embrionului (şi ulterior a fătului), aceste membrane sunt necesare pentru asigurarea nutriţiei, respiraţiei şi excreţiei.

***Sacul galben** este cea mai primitivă dintre cele patru membrane extraembrionare, fiind prezentă la toate organismele amniotice (mamifere, păsări, reptile). La mamifere şi om sacul galben se dezvoltă pe seama mezodermului plăcii laterale splanhnice şi a endodermului. Sacul galben este important deoarece:*

– celulele germinale primordiale traversează sacul galben în cursul migrării lor dinspre epiblast către creasta genitală;

– este sursa primelor celule sangvine şi a majorităţii vaselor sangvine.

***Amniosul** este membrana extraembrionară situată cel mai intern, rămânând ataşată şi în contact direct cu embrionul. Amniosul se dezvoltă din ectoderm şi mezodermul plăcii laterale somatice. Sacul amniotic conţine lichidul amniotic care protejează embrionul împotriva şocurilor mecanice.*

***Corionul** se dezvoltă de asemenea din ectoderm şi mezodermul plăcii laterale somatice şi este format din celule trofoblastice care produc enzime ce erodează epiteliul uterului, ajutând la implantarea embrionului în peretele uterin. Corionul este de asemenea o sursă de hormoni (gonadotropinele corionice) care remodelează peretele uterin. Corionul serveşte ca o suprafaţă de schimb respirator. La mamiferele placentare corionul formează componenta fetală a placentei.*

***Alantoida** este cea mai recentă membrană extraembrionară din punct de vedere al evoluţiei. Ea se dezvoltă din porţiunea posterioară a canalului digestiv. Vasele alantoidei formează vasele cordonului ombilical.*

***Placenta** este prezentă numai la o parte a mamiferelor şi este derivată în parte din produsul de concepţie şi în parte din peretele uterin. Se dezvoltă după implantare când embrionul induce un răspuns din partea endometrului matern, modificându-l într-un ţesut puternic vascularizat numit decidua. În săptămânile a doua şi a treia de dezvoltare ţesutul trofoblastic devine vacuolar, iar vacuolele se conectează cu capilarele materne din vecinătate, umplându-se rapid cu sânge. Pe măsură ce corionul se dezvoltă, acesta proiectează în interiorul vacuolelor o serie de prelungiri numite vili corionici, aducând astfel vasele materne şi cele embrionare în strâns contact. Iniţial embrionul este complet înconjurat de decidua; pe măsură ce acesta creşte, decidua capsularis se subţiază şi apoi dispare, în timp ce decidua basalis formează placenta matură.*

CASETA 15.3

Formarea gemenilor umani

Circa una din 200 sarcini la om conduce la naşterea unor gemeni. Există două tipuri de gemeni:dizigoţi şi monozigoţi.

***Gemenii dizigoţi** apar ca urmare a fertilizării independente a două ovocite. Aceştia au membrane extraembrionare separate, iar din punct de vedere genetic sunt la fel de diferiţi ca orice alţi fraţi.*

***Gemenii monozigoţi** se dezvoltă ca urmare a unui eveniment de fertilizare unic, urmat de diviziunea timpurie a embrionului. Circa o treime din gemenii monozigoţi apar ca urmare a diviziunii precoce a embrionului, până în stadiul de morulă. În asemenea circumstanţe se formează doi blastocişti separaţi, care vor conduce la dezvoltarea de membrane extraembrionare independente. În două treimi din cazuri, separarea se produce în stadiul de blastocist şi implică diviziunea masei celulare interne. Dacă separarea se produce înainte de ziua a 9-a postfertilizare (momentul formării amniosului), gemenii împart aceeaşi cavitate corionică, dar au fiecare un amnios separat. Într-un procent foarte redus de cazuri separarea se produce după ziua a 9-a şi, în acest caz, ei se dezvoltă în interiorul unui amnios comun. În asemenea circumstanţe separarea embrionilor poate fi uneori incompletă sau ei se pot fuziona parţial ulterior, conducând la naşterea de **gemeni siamezi**.*

BCU "M. EMINESCU" IAŞI

c). Implantarea

În a 5-a zi de dezvoltare este eliberată o enzimă care penetrează şi degradează parţial zona pelucida, permiţând eliberarea blastocistului în interiorul cavităţii uterine. Ca urmare, blastocistul interacţionează direct cu celulele endometriale ale uterului, iar în ziua a 6-a începe procesul de *implantare* (figura 15.1.A). Celulele trofoblastice proliferează rapid şi se diferenţiază într-un strat intern, *citotrofoblastul*, şi un strat de celule multinucleare externe, *sinciţiotrofoblastul*. Acesta din urmă invadează ţesutul conjunctiv al uterului.

Chiar înainte de începerea procesului de implantare, celulele masei celulare interne încep să se diferenţieze în două straturi distincte:

- stratul extern (*epiblastul*, sau *ectodermul primitiv*) care va da naştere ectodermului, endodermului şi mezodermului (adică tuturor ţesuturilor embrionare), precum şi amniosului, sacului galben şi alantoidei.
- stratul intern (*hipoblastul*, *endodermul primitiv* sau *endodermul visceral*) care va da naştere mezodermului extraembrionar ce căptuşeşte sacul galben primitiv şi blastocelul.

În interiorul masei celulare interne se formează o a doua cavitate umplută cu fluid, numită *amnios*. Ca urmare, embrionul are acum o structură discoidală bilamelară (epiblast şi hipoblast) şi este situat între două cavităţi umplute cu lichid: cavitatea amniotică pe o parte şi sacul galben de cealaltă (figura 15.1.B).

d). Gastrulaţia

În a doua săptămână de dezvoltare începe procesul de gastrulaţie (zilele 14-28), prin care celulele blastocistului migrează şi se rearanjează, formând în final embrionul trilamelar, cu cele trei pături (straturi/foiţe) germinative definitive – *ectodermul, endodermul şi mezodermul*. Formarea acestor pături este o premiză obligatorie pentru etapa următoare de organogeneză. Gastrulaţia include şi formarea ţesuturilor extraembrionare ce derivă din trofoblast.

Evenimentul major al gastrulaţiei (cu care începe săptămâna a treia a dezvoltării) este formarea *liniei primitive*, care apare ca o îngroşare a ţesutului epiblastic, cu originea în porţiunea posterioară a embrionului (la nivelul nodului Hensen) şi orientare antero-posterioară. De-a lungul acestei structuri au loc procese intense de *migrare* a unor celule epiblastice (figura 15.2) care vor forma mai întâi endodermul definitiv şi apoi mezodermul; concomitent, epiblastul este transformat în ectoderm şi astfel se constituie *embrionul trilamelar*. Genele exprimate în timpul gastrulaţiei codifică proteine ce facilitează proliferarea şi deplasarea celulelor.

- *Mezodermul* se împarte în cinci componente: notocordul, mezodermul dorsal, intermediar, lateral şi mezenchimul capului. *Notocordul* este o structură tranzitorie, situată pe linia mediană, care induce formarea tubului neural şi este implicat în specificarea axelor. *Mezodermul* dorsal (paraxial) se segmentează în somite, care dau naştere elementelor ce formează scheletul axial, muşchii scheletici şi ţesutul conjunctiv al tegumentelor. *Mezodermul intermediar* va forma rinichii şi aparatul genitourinar. *Mezodermul plăcii laterale* va constitui cordul, ţesutul conjunctiv al viscerelor şi elementele conjunctive ale amniosului şi corionului. În sfârşit, *mezenchimul* capului va da naştere muşchilor capului şi muşchilor extrinseci ai globilor oculari.
- *Endodermul* embrionar va forma tractul digestiv, ficatul şi pancreasul, precum şi aparatul respirator; endodermul produce, de asemenea, şi pungile faringiene care împreună cu celulele migrate din crestele neurale vor da

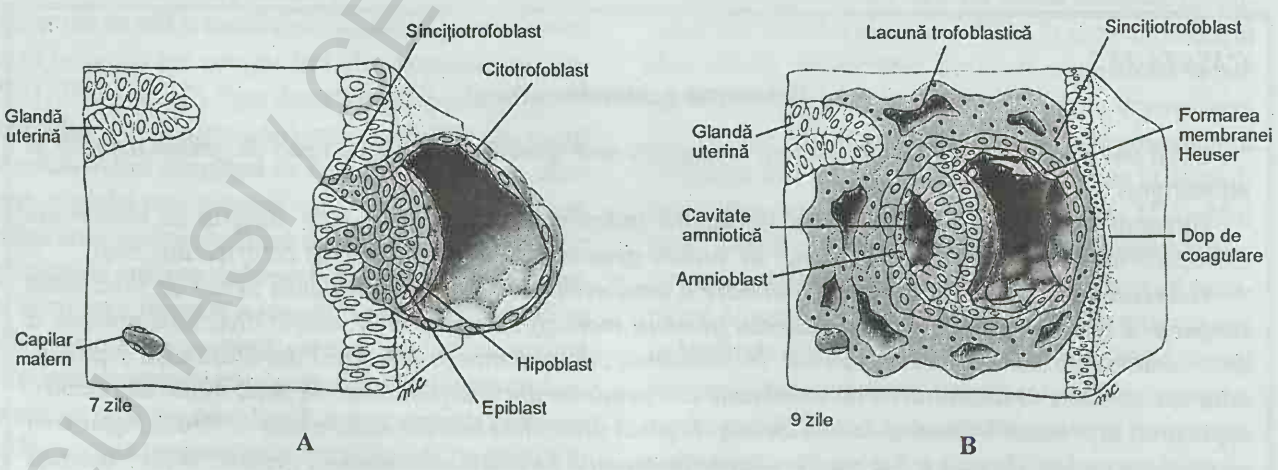


Figura 15.1. Implantarea blastocistului în endometrul uterin

(după Larsen, 1998)

A. Ziua 7: Trofoblastul proliferează la polul embrionar şi formează sincitiotrofoblastul care invadează endometrul; discul embrionar bilaminar este format din hipoblast şi epiblast.
B. Ziua 9. Embrionul este complet implantat; apare cavitatea amniotică.

BCU IAŞI / CENTRUL UNIVERSITAR

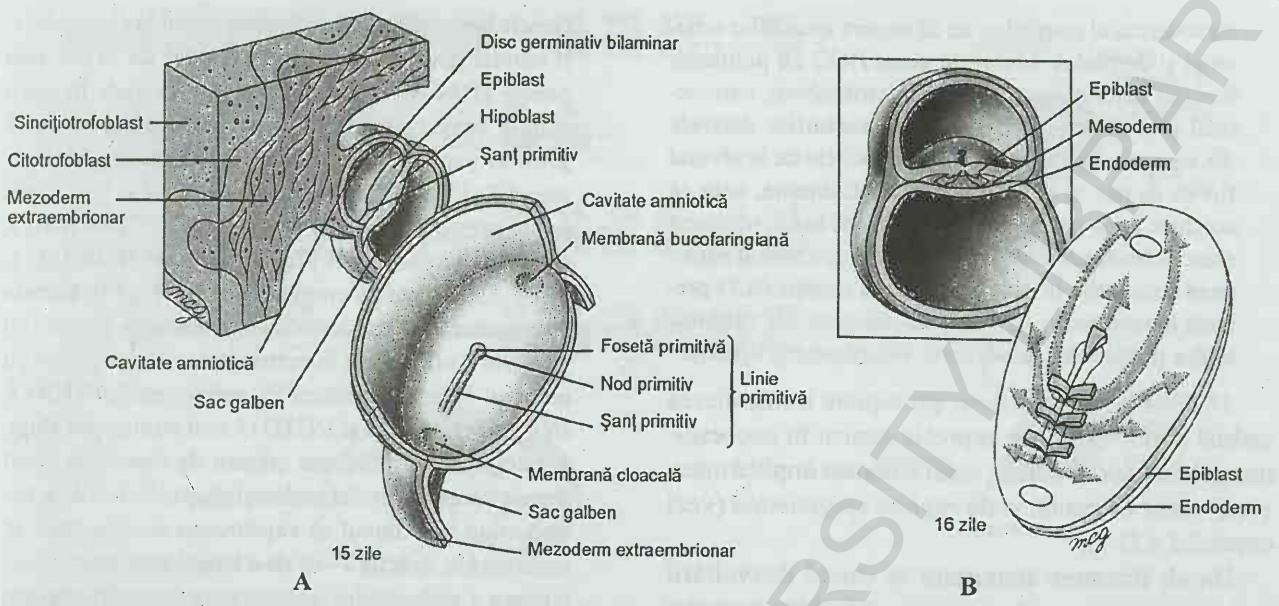


Figura 15.2. Formarea liniei primitive (A) şi procesele de migraţie celulară (B) şi de diferenţiere a celor trei pături germinale în cadrul gastrulaţiei la embrionul uman

naştere urechii medii, timusului, paratiroidelor şi tiroidei. Numeroase structuri derivate din endoderm se realizează prin înmugurire şi ramificare; aceste procese sunt controlate de *factorii de creştere fibroblastică (FGF)* şi de *proteinele morfogenetice osoase (BMP)* împreună cu *receptorii lor.*

- *Ectodermul* embrionar va forma epidermul şi anexele pielii, sistemul nervos central şi periferic, adenohipofiza, glandele parotide şi glandele mamare.

2.1.2. Caracteristici esenţiale ale dezvoltării embrionare precoce

În cadrul dezvoltării embrionare precoce un element important îl constituie *evoluţia ierarhizată* a programelor de dezvoltare şi *restricţia progresivă* a potenţialului de diferenţiere (figura 15.3). Astfel, până în stadiul de embrion cu 8-16 celule, blastomerele sunt *totipotente*, adică pot da naştere oricărei celule a organismului. Odată cu primul proces de diferenţiere în celule trofoblastice şi celule ale masei celulare interne, acestea din urmă sunt considerate *pluripotente*: ele pot forma orice celulă din structura embrionului, dar nu mai pot forma structuri extraembrionare. După iniţierea gastrulaţiei şi formarea celor trei straturi germinale, celulele devin *multipotente*. În timp, odată cu parcurgerea unor etape ulterioare de diferenţiere se formează *celule progenitoare unipotente* care vor da naştere *celulelor diferenţiate* ce vor îndeplini funcţii specializate.

Fiecare celulă se află – la un moment dat al dezvoltării – într-o anumită etapă a programului său de dezvoltare, care îi va stabili soarta (*cell fate*). Modul specific, previzibil şi repetabil în care o anumită celulă sau regiune embrionară va evolua prin diferenţiere pentru a da naştere anumitor structuri specifice se numeşte *predestinare* (*commitment*) sau *angajare*; prima fază a procesului de atribuire a predestinării celulare, în care evoluţia spre diferenţiere a celulei este variabilă în funcţie de stimulii din mediu extern se numeşte *specificaţie*; a doua fază a procesului de atribuire a predestinării celulare, în care direcţia de dezvoltare a celulei nu mai poate fi influenţată de mediul embrionar exterior (autonomie celulară) se numeşte *determinare.*

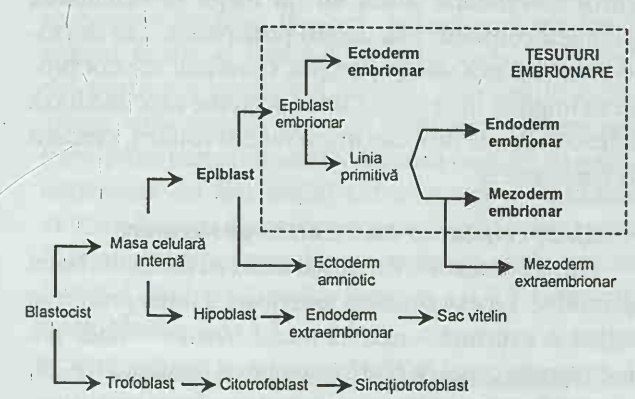


Figura 15.3. Evoluţia ierarhizată a diferenţierii celulare în cursul dezvoltării embrionare precoce

Evoluţia ierarhizată a programelor de dezvoltare este realizată în mare măsură prin intervenţia unor *factori de transcripţie cu specificitate tisulară*, care vor alcătui *combinaţii particulare*, specifice pentru anumite structuri. Ca urmare, mutaţii ale unor asemenea factori de transcripţie vor determina anomalii congenitale ce afectează preponderent ţesuturile la nivelul cărora aceste gene sunt exprimate.

Un exemplu edificator pentru rolul factorilor de transcripţie cu specificitate tisulară este mutaţia genei *PAX3* care codifică un factor de transcripţie exprimat în cursul dezvoltării la nivelul crestei neurale, precum şi la nivelul

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mezodermului somitelor, ce dă naştere muşchilor scheletici şi dermului. Mutaţiile genei *PAX3* cu pierderea funcţiei determină *sindromul Waardenburg*, caracterizat prin deficienţa dezvoltării structurilor derivate din creasta neurală, precum melanocitele de la nivelul firelor de păr, al ochilor şi al urechii interne, ceea ce conduce la aspectele caracteristice ale bolii: prezenţa meşei albe de păr frontal, heterocromia iriană şi surditatea senzorială. În plus, pacienţii cu mutaţii *PAX3* prezintă hipertelorism şi, ocazional, anomalii ale extremităţilor membrelor (sindromul Waardenburg tip III).

Menţinerea diferenţierii presupune transmiterea stabilă a modelului de expresie genică în succesiunea generaţiilor de celule; acest fenomen implică intervenţia unor mecanisme de *reglare epigenetică* (vezi capitolul 4.D.1).

Un alt fenomen important în cursul dezvoltării embrionare precoce este *migrarea celulară* (de exemplu, migrarea celulelor crestei neurale, a celulelor germinale sau a celulelor hematopoietice). Bazele moleculare ale acestui fenomen sunt înţelese însă numai parţial, roluri majore fiind atribuite unor molecule implicate în procese precum *semnalizarea paracrină* şi *adeziunea celulară*.

2.1.3. Specificarea axelor

La om, ca şi la restul cordatelor, există trei axe a căror *specificaţie* joacă un rol major în orientarea planului corpului: axa antero-posterioară, axa dorso-ventrală şi axa stânga-dreapta. Controlul acestor procese implică intervenţia unor proteine care mediază adeseori şi alte procese în cursul dezvoltării, precum organogeneza.

a). Specificarea axei antero-posterioare

Acest proces este declanşat odată cu formarea liniei primitive. La extremitatea anterioară a liniei primitive există o structură – numită *nodul Hensen* – unde are loc expresia genei *NODAL* (membru al familiei *TGF-β*), necesară pentru iniţierea şi menţinerea liniei primitive, iar mai târziu pentru formarea axei stânga-dreapta.

Controlul *specificării* axei antero-posterioare este realizat de către o serie de gene ce codifică factori de transcripţie care au un domeniu de legare la ADN numit *homeodomeniu*. Aceste gene numite şi **gene homeotice** sunt reprezentate la om de *genele HOX*. Anumite *combinaţii* ale genelor *HOX* marchează diferite regiuni în lungul axului antero-posterior al corpului şi membrelor, determinând o evoluţie specifică. Mutaţiile genelor *HOX* determină anomalii în modul de dezvoltare ale corpului, membrelor şi diferitelor organe.

Genele homeotice au fost descrise iniţial la *Drosophila*[1] şi numite gene HOM-C. Echivalentul lor la om sunt ***genele HOX***. Cele 39 de gene sunt grupate în patru regiuni cromozomiale care conţin fiecare până la 11 gene: 11 gene *HOXA* (1-7, 9-11 şi 13, situate pe cromozomul 7p15-p14.2), 10 gene *HOXB* (1-9 şi 13, situate pe cromozomul 17q21-q22), 9 gene *HOXC* (4-6 şi 8-13, situate pe cromozomul 12q13) şi 9 gene *HOXD* (1, 3, 4 şi 8-13, situate pe cromozomul 2q31-q32). Genele sunt numerotate în funcţie de omologia lor (genele cu numărul 1 aflându-se în extremitatea 3', iar genele cu numărul 13 în extremitatea 5'); astfel, genele *HOXA13*, *HOXB13*, *HOXC13* şi *HOXD13* sunt numite **paralogi**. Paralogii au un grad mai crescut de omologie decât genele situate la nivelul aceluiaşi grup (*cluster*) de gene. Important este faptul că exprimarea acestor gene se realizează în direcţia 3'→5' de-a lungul axei antero-posterioare a embrionului (*coliniaritate spaţială*), precum şi faptul că genele situate în extremitatea 3' sunt exprimate mai precoce decât genele situate în poziţia 5' (*coliniaritate temporală*). Astfel, expresia genei *HOXA1* este mai precoce şi într-o poziţie anterioară faţă de expresia genei *HOXA2* (figura 15.4). În realitate, există o suprapunere parţială a regiunilor care exprimă un anumit set de gene *HOX*. Combinaţiile particulare care rezultă specifică şi determină, foarte probabil, poziţia celulelor şi a ţesuturilor, indicând formarea de regiuni specifice de-a lungul trunchiului şi membrelor.

b). Specificarea axei dorso-ventrale

Acesta este un proces activ, aflat sub controlul a doi centri de semnalizare: nodul Hensen şi endodermul visceral anterior, care produc semnalele de dorsalizare (*Noggina* şi *Chordina*) şi respectiv de ventralizare (*proteina BMP4*).

Nodul Hensen conţine o serie de celule ce formează *organizatorul Spemann-Mangold* care exprimă aproape în exclusivitate două proteine esenţiale: Noggina şi Chordina. Noggina este o proteină secretată care induce formarea ţesutului neural din ectoderm şi dorsalizarea mezodermului vecin. Chordina este o altă proteină secretată care previne ventralizarea mezodermului dorsalizat. În contrast, endodermul ventral anterior secretă proteina BMP4, care induce ventralizarea mezodermului vecin, precum şi *factorii de transcripţie* LIM1, OTX2, HESX1 sau factorul paracrin *Cerberus*.

În prezent, se ştie că Noggina şi Chordina se leagă direct la BMP4 şi previn legarea sa la nivelul receptorului corespunzător. Ca urmare, organizatorul promovează dorsalizarea prin reprimarea semnalului de ventralizare indus de către proteina BMP4 (figura 15.5).

1. Mutaţiile genelor HOM-C determină înlocuirea antenelor cu formarea unor picioare, fenotip denumit *Antennepedia*.

BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

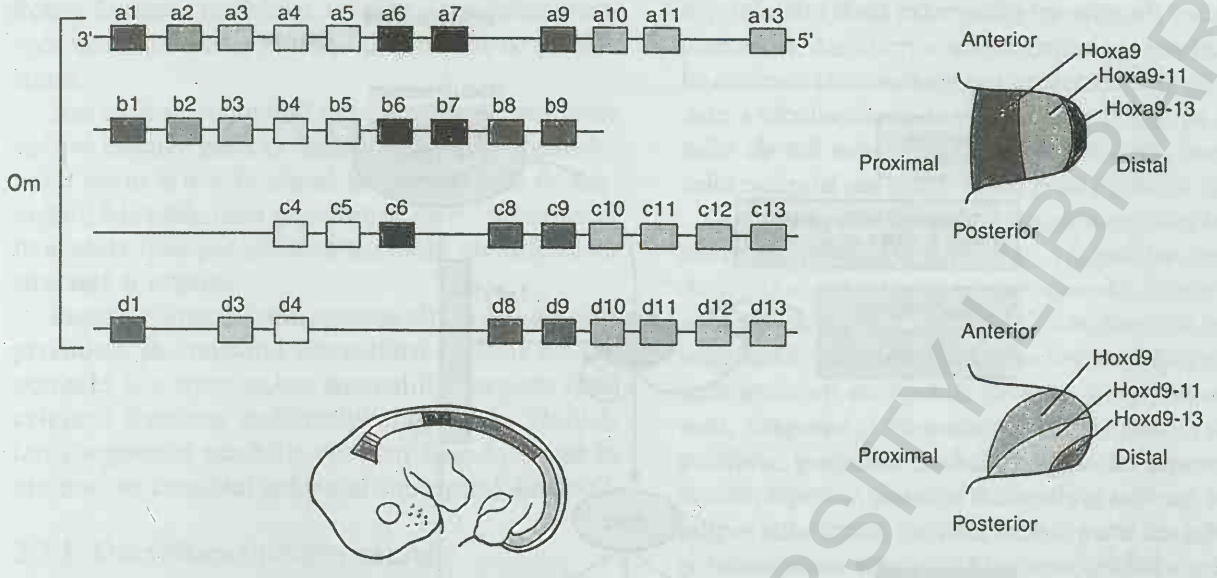


Figura 15.4. Dispoziția și acțiunea genelor HOX la om

(modificat după Nussbaum *et al.*, 2001)

Combinații ale genelor HOX exprimate în lungul axului anteroposterior al embrionului determină modul de dezvoltare a fiecărui regiuni; în mugurii membrelor anumite combinații ale genelor HOXA și HOXD exprimate în lungul axelor proximal-distal și anteroposterior determină dezvoltarea anumitor segmente

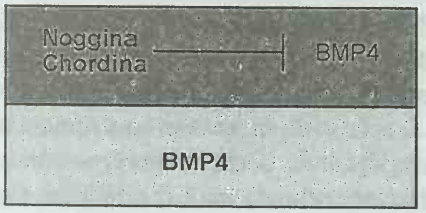


Figura 15.5. Semnale implicate în dorsalizarea sau ventralizarea mezodermului

c). Specificarea axei stânga-dreapta

Poziția finală a organelor dispuse asimetric este dobândită prin mecanisme diferite.

Unele organe (cord, ficat) se dezvoltă inițial pe linia mediană, pentru a deveni lateralizate ulterior în cursul dezvoltării. Alte organe (precum unele vase sangvine) se dezvoltă inițial ca structuri-pereche, iar ulterior, prin regresia unuia, lasă o structură lateralizată. În sfârșit, există organe (de exemplu, plămânii drept și stâng) care se dezvoltă de la început ca organe asimetrice față de linia mediană. Înțelegerea mecanismelor moleculare care dirijează specificarea axei stânga-dreapta s-a realizat prin studii pe modele animale, precum și prin studiul unor anomalii congenitale – denumite **defecte de lateralitate** (1 la 10.000 de naşteri) – în care acest proces este perturbat. Poziția normală a organelor în raport cu axa stânga-dreapta este numită *situs solitus*. Imaginea completă în oglindă a aranjării organelor în raport cu această axă este numită *situs inversus* (de obicei asimptomatică). Modificările în dispoziția unor organe asimetrice, unele având o poziție normală, sunt denumite *situs ambiguus (heterotaxie)*.

Procesul prin care este stabilită asimetria stânga-dreapta poate fi împărțit în *patru etape* (figura 15.6). Evenimentul inițial pare a fi alterarea simetriei în apropierea nodului Hensen, proces care are loc în stadiul tardiv al formării șanțului neural. Celulele din porțiunea ventrală a nodului sunt celule monociliate, cilii rotindu-se rapid (600 rpm) în sens orar (priviți din partea ventrală). Această mișcare de rotație determină un *flux nodal* către stânga al lichidului extraembrionar din apropierea nodului[2], care ar putea fi implicat în transportul unor molecule-cheie, precum factorul de diferențiere/creştere tip 1 (GDF1) sau proteina Nodal.

O legătură între mișcarea ciliară și determinarea axei stânga-dreapta a fost suspectată din momentul descoperirii *sindromului Kartagener* – o boală genetică relativ rară care include *situs inversus*. În acest sindrom s-a observat pierderea motilității cililor epiteliului respirator și al flagelului spermatozoizilor, datorită unor mutații ale dineinei, o proteină cu activitate motorie asociată microtubulilor. Dineina ar putea interacționa cu ZIC3 (proteina cerebelară cu degete de zinc tip 3), un factor de transcripție din familia GLI. Mutații ale acestei gene au fost identificate, de asemenea, la pacienți cu defecte de lateralitate.

Alterarea inițială a simetriei determină exprimarea exclusiv pe partea stângă a proteinei Nodal, moleculă

2. Fluxul nodal este afectat la șoareci mutanți care prezintă *situs inversus*, ceea ce susține implicarea fluxului nodal în determinarea axei stânga-dreapta.

BCU / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

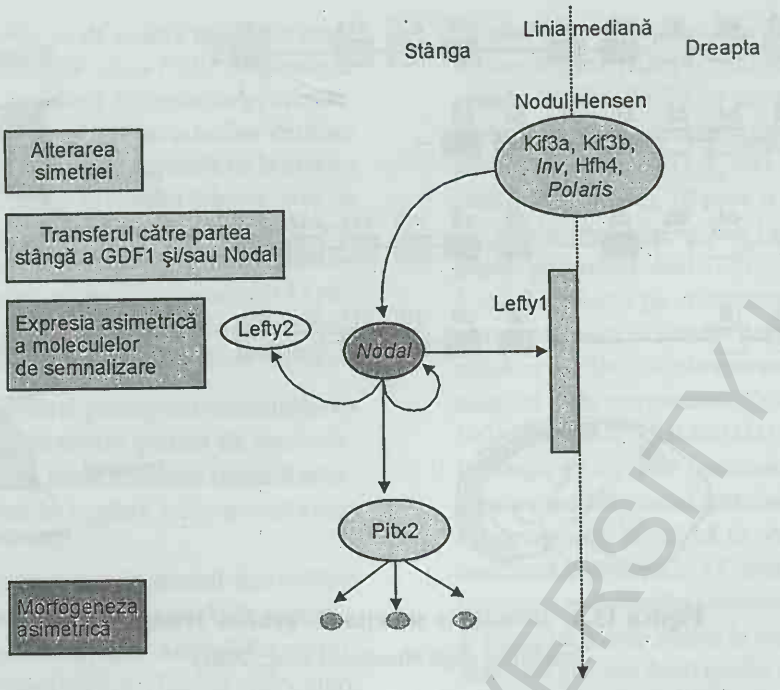


Figura 15.6. Căile genetice în determinismul asimetriei dreapta-stânga
(după Hamada *et al.*, 2002)

din familia TGF-β. Acțiunea Nodal este inhibată de către o altă moleculă din familia TGF-β, proteina Lefty2 (LEFTYB la om), care acționează ca o moleculă de feedback negativ. Expresia stângă a Nodal şi Lefty2 începe, în stadiul de 2-3 somite, într-o mică regiune din vecinătatea nodului, se extinde bidirecțional de-a lungul axei antero-posterioare şi dispare către stadiul de 6-7 somite. Semnalul indus de Nodal este mediat de către un factor de transcriere, Pitx2 (la om PITX2, implicat în producerea sindromului Rieger). Genele situate în aval, responsabile de morfogeneza asimetrică, nu sunt încă cunoscute. În sfârşit, Nodal induce şi expresia unei a treia molecule din familia TGF-β, proteina Lefty1 (la om LEFTYA), care acționează ca o barieră mediană a semnalelor ce determină specificarea părții stângi a corpului.

2.2. *Etapa embrionară tardivă – organogeneza*

Această etapă este dominată de procese intense de *morfogeneză*, care au ca rezultat final constituirea organelor şi a sistemelor în forma lor finală. Continuă, de asemenea, procesele de *diferențiere celulară* inițiate în etapa precedentă, care vor conduce la formarea celulelor înalt diferențiate, de tip adult (precum melanocitele, fibroblaştii sau keratinocitele). Evoluția specifică a acestor celule a fost însă deja *prestabilită* în etapa de dezvoltare embrionară precoce (de exemplu, dezvoltarea melanocitelor are loc din celulele crestei neurale). Proceselor de diferențiere celulară li se adaugă procese intense de *proliferare celulară*, care sunt responsabile de creşterea rapidă a dimensiunilor embrionului şi ulterior ale fetusului. Între procesele de diferențiere celulară şi cele de proliferare există însă adeseori o relație de inversă proporționalitate: pe măsura creşterii gradului de diferențiere scade potențialul de proliferare, celulele înalt diferențiate fiind frecvent lipsite complet de capacitatea de diviziune celulară. Ca urmare, asigurarea proceselor de creştere (inclusiv postnatale), precum şi a celor de reparare celulară este posibilă în bună parte pe seama *celulelor stem*. Aceste celule îşi păstrează capacitatea de multiplicare de-a lungul întregii vieți (prin mecanisme complexe, precum menținerea activității telomerazei). În sfârşit, proceselor de proliferare li se adaugă şi procese inverse, de *apoptoză* (sau moarte celulară programată). Acest proces este extrem de important în formarea organelor şi va fi prezentat separat în cadrul subcapitolului 15.A.3.

Un fenomen important care precede organogeneza este *formarea modelelor*, procesul prin care celulele diferențiate sunt aranjate *spațial* formând țesuturi şi organe. *Specificarea regională* are loc în mai multe etape: (1) definirea celulelor dintr-o regiune; (2) stabilirea centrelor de semnalizare care furnizează informații poziționale; (3) diferențierea celulelor din regiunea respectivă ca răspuns la semnale adiționale. Spre exemplu, celulele ce vor forma membrele superioare se diferențiază în condrocite, osteocite etc.; aceste celule trebuie însă să fie aranjate într-un model temporo-spațial care să formeze un os funcțional. Alte informații vor stabili dacă acest os va deveni humerus, radius sau cubitus şi va ocupa o poziție specifică.

BCU IAŞI / CAROL I UNIVERSITY LIBRARY

Pentru formarea modelelor, celulele şi ţesuturile *comunică* unele cu altele, folosind diferite căi de semnalizare.

Aşa cum se poate însă intui, o serie de gene care au fost inactive până în momentul iniţierii organogenezei devin active în cursul acestor procese de dezvoltare. Mutaţiile unor gene care au un rol determinant în această fază pot produce anomalii ale diferitelor structuri şi organe.

În cele ce urmează vom prezenta câteva date succinte privitoare la controlul dezvoltării tubului neural, cordului şi a membrelor, anomaliile acestora fiind cele mai frecvente malformaţii congenitale. Dezvoltarea organelor genitale, cea mai bine înţeleasă în prezent, va constitui subiectul subcapitolului 15.C.

2.2.1. Dezvoltarea tubului neural

Dezvoltarea sistemului nervos marchează începutul organogenezei. Acest proces începe la sfârşitul celei de-a treia săptămâni de dezvoltare intrauterină. Evenimentul iniţial este inducţia ectodermului situat deasupra notocordului, cu formarea unei pături groase de celule neuroepiteliale numită *placa neurală*. Aceasta apare în ziua 18 de dezvoltare embrionară şi creşte ulterior rapid pe parcursul următoarelor două zile. La circa 20-22 zile după fertilizare se iniţiază un proces numit *neurulaţie* care transformă placa neurală în *tubul neural*, precursorul creierului şi al măduvei spinării (vezi figura 15.7A). Procesul începe prin apariţia unei depresiuni în porţiunea ventrală a plăcii neurale, care se extinde de-a lungul liniei mediane, formând *şanţul neural*. Placa neurală se pliază în jurul şanţului neural şi formează *tubul neural* care începe să se închidă în regiunea medie a embrionului. Procesul de închidere a tubului neural se extinde apoi ca un fermoar în ambele direcţii. Iniţial tubul neural este deschis la nivelul celor două extremităţi (neuroporii anterior şi posterior), dar ulterior aceste orificii se vor închide. În anumite circumstanţe pot apărea defecte de închidere a tubului neural ce vor conduce la apariţia *defectelor de tub neural* (spina bifida lombară, encefalocelul occipital sau anencefalia) (vezi capitolul 14.C.1).

În cursul neurulaţiei, de-a lungul marginilor laterale ale tubului neural se formează o populaţie specifică de celule numite *celulele crestei neurale*. Aceste celule *se detaşează* de pe tubul neural şi *migrează* la nivelul unor sedii specifice ale organismului, dând naştere unor structuri extreme de diverse: ganglionii senzoriali, simpatici şi parasimpatici ai sistemului nervos periferic, porţiunea medulară a glandei suprarenale, tiroida, hipofiza, glandele lacrimale şi salivare, ţesutul adipos subcutanat, melanocitele, o parte din scheletul şi musculatura feţei etc. Afectarea celulelor crestelor neurale va determina producerea de anomalii aparent necorelate, localizate la distanţă, care pot fi însă grupate în aceeaşi categorie de afecţiuni numite **neurocristopatii** (vezi caseta 15.4).

Imediat ce este finalizată formarea tubului neural, porţiunea cranială a acestuia formează *trei vezicule cerebrale* largi (viitorul creier), în timp ce porţiunea caudală rămâne mai îngustă (viitoarea măduvă a spinării). Această *polaritate antero-posterioară* reflectă specificitatea regională a semnalelor de inducţie care sunt iniţiate la nivelul notocordului. *Polaritatea dorso-ventrală* este determinată ca urmare a unor seturi opuse de semnale emise de notocord şi de ectoderm. La acestea se adaugă fenomene de *inhibiţie laterală* care au un rol major în diferenţierea unor seturi specifice de neuroni.

Natura semnalelor de inducţie este încă incomplet cunoscută; se cunoaşte însă că aceste semnale activează seturi diferite de factori de transcripţie de-a

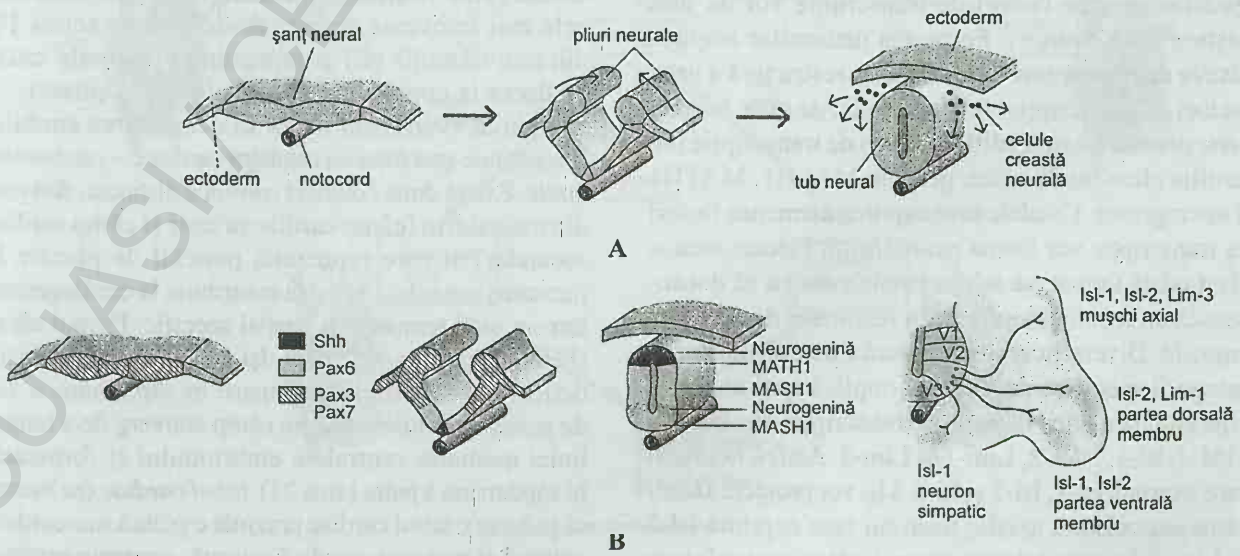


Figura 15.7. Formarea tubului neural (A) şi diferenţierea sistemului nervos (B)
(după Strachan şi Read, 2010)

BCU IAŞI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

CASETA 15.4

Neurocristopatiile

În 1974, Bolande a introdus conceptul de neurocristopatii, referitor la câteva tumori (feocromocitom, neuroblastom etc.) ce implică ţesuturi cu aceeaşi origine embrionară; ulterior termenul a fost folosit pentru toate defectele de dezvoltare despre care se poate afirma cu certitudine că au la origine anomalii ale crestei neurale. Celulele crestelor neurale sunt diseminate în tot embrionul şi se diferenţiază în structuri dintre cele mai diverse (melanocite, ţesutul conjunctiv al feţei, structuri cardiace, sistem nervos enteric etc.), astfel încât neurocristopatiile pot fi încadrate în categoria defectelor de câmp politopic. Din punctul de vedere al dezvoltării embrionare, maladii extrem de variate ca aspect clinic şi localizare sunt generate prin defecte de migrare a celulelor din creasta neurală.

Derivatele crestelor neurale, sindroamele asociate şi genele implicate sunt următoarele:

- *rombomerele: R2-R3 (primul arc branhial) – sindromul Goldenhar, sindromul Franceschetti (5q32); R4-R5 (al doilea arc branhial) – sindromul Moebius; R6-R8 (al treilea şi al patrulea arc branhial) – secvenţa Pierre Robin, sindromul velo-cardio-facial (microdeleţiile 22q11.2 sau 10p14);*
- *melanoblastele: Piebaldism (cKIT), sindromul Waardenburg (PAX3, MITF);*
- *neuroblastele: boala Hirschprung (cRET, EDN3, EDNRB, GDNF);*
- *celulele C ale tiroidei şi suprarenalelor: MEN 2A, MEN2B, FMTC;*
- *tumorile: feocromocitomul, neuroblastomul, cancerul tiroidian medular.*

lungul tubului neural. Astfel, în porţiunea anterioară şi mijlocie a tubului neural sunt activaţi factori de transcripţie din familiile Emx şi Otx, în timp ce porţiunea caudală este controlată de gene din familia *Hox*. Polaritatea dorso-ventrală este rezultatul efectelor de ventralizare ale Shh emise de notocord, în opoziţie cu efectele de dorsalizare ale BMP4, BMP7 şi Dorsalinei, proteine secretate de ectoderm. Ca urmare a acestor semnale opuse, tubul neural este împărţit în zone discrete, caracterizate prin expresia diferenţiată a unor factori de transcripţie specifici precum Dbx1, Irx3 şi NKx6.1. De exemplu, porţiunea ventrală a tubului neural, care exprimă doar NKx6.1, va deveni populată de neuroni motori. Nu toate celulele aflate în interiorul acestor zone discrete marcate de expresia specifică a unor factori de transcripţie vor da însă naştere unor neuroni. Formarea neuronilor implică câteva etape adiţionale de expresie restrictivă a unor factori de transcripţie. Primele astfel de gene numite *gene proneuronale* codifică factori de transcripţie din familia elice-buclă-elice, precum MASH1, MATH1 şi neurogenina. Celulele care exprimă asemenea factori de transcripţie vor forma *neuroblaştii*. Fiecare neuroblast odată format, va inhiba celulele din jur să dobândească un fenotip similar, prin fenomene de *inhibiţie laterală*. Diversificarea ulterioară a neuroblaştilor în categorii specifice de neuroni implică apoi expresia diferenţială a unor factori de transcripţie din familia LIM: Islet-1, Islet-2, Lim-1 şi Lim-3. Astfel, neuronii care exprimă Isl-1, Isl-2 şi Lim-3 îşi vor proiecta axonii către musculatura axială; neuronii care exprimă Isl-2 şi Lim-1 îşi proiectează axonii către musculatura dorsală a membrelor; neuronii care exprimă Isl-1 şi Isl-2 îşi proiectează axonii către muşchii ventrali ai membrelor, în timp ce cei care exprimă doar Isl-1 îşi proiectează axonii către ganglionii simpatici (vezi figura 15.7.B). Odată ce primii axoni şi-au atins ţinta, alţi axoni pot urma aceeaşi cale de-a lungul axonilor preexistenţi, proces numit *fasciculaţie*.

2.2.2. Dezvoltarea cordului

Formarea cordului (săptămânile 2-10 de dezvoltare intrauterină) implică o serie de evenimente precis orchestrate (care necesită intervenţia unor gene variate). Prezentarea reperelor embriologice şi a genelor implicate în dezvoltarea cordului urmăreşte să demonstreze complexitatea moleculară a acestui proces, precum şi corelaţia dintre mutaţiile genelor şi diferite sindroame genetice asociate cu malformaţii cardiace (vezi caseta 15.5). Malformaţiile congenitale de cord sunt cele mai frecvente defecte de dezvoltare (circa 1% din nou-născuţii vii) şi reprezintă principala cauză de deces la copii (excluzând bolile infecţioase).

Primul eveniment major în dezvoltarea cordului îl constituie *specificarea* celulelor cardiace – *cardiomiocitele*. Există două *câmpuri cardiace* distincte, derivate din mezoderm (câmp cardiac primar şi câmp cardiac secundar) şi care reprezintă punctul de plecare în formarea cordului. Acestea contribuie la cardiogeneză într-un mod temporal şi spaţial specific. Primul câmp (FHF – „*first heart field*"), îşi are originea în mezodermul lateral anterior şi apare în săptămâna a 2-a de gestaţie. Celulele acestui câmp converg de-a lungul liniei mediane ventrale a embrionului şi formează, în săptămâna a patra (ziua 23), *tubul cardiac* (ce începe să pulseze); tubul cardiac prezintă o pătură miocardică externă şi una endocardică internă, separate printr-o matrice extracelulară. Acest proces este guvernat de factori de transcripţie din familia GATA.

Câmpul cardiac secundar (SHF – *„second heart field"*), marcat prin expresia factorului de transcripție Isl1 se află localizat posterior față de câmpul primar, în zona mezodermului faringian. Celulele câmpului secundar rămân relativ nediferențiate până în momentul procesului de *încurbare către dreapta a tubului cardiac*. Cu această ocazie, celulele câmpului secundar străbat mezodermul faringian şi vor popula o regiune care va forma viitorul ventricul drept şi porțiuni ale ambelor atrii. În schimb, ventriculul stâng este format aproape exclusiv pe seama câmpului primar.

Fiecare din camerele cordului diferă prin caracteristicile sale morfologice şi contractile, ca şi prin tipurile de gene exprimate (vezi figura 15.8). *Formarea ventriculelor* este dependentă de expresia genei *IRX4*, aflată sub controlul genei *NKX2.5*. Factorul de transcripție HAND1 controlează formarea ventriculului stâng, în timp ce expresia HAND2 guvernează formarea ventriculului drept. Un cofactor pentru dezvoltarea ventriculelor este şi proteina MEF2C. *Dezvoltarea atriilor* se află sub controlul reçeptorului nuclear COUP-TFII şi a factorului de transcripție PITX2. Proliferarea cardiomiocitelor este controlată de neuregulină, de receptorii ERBB2 şi ERBB4 şi de factori angiogenici, precum VEGF şi angiopoietina 1. Defecte ale acestor factori asociază anomalii ale trabeculației ventriculare. O parte dintre cardiomiocite evoluează divergent şi vor da naştere *sistemului de conducere*; un rol major în controlul acestui proces îl au genele care codifică endotelina 1, conexina 40 şi factorul de transcripție HF1B. Pe lângă factorii de transcripție menționați mai sus, un rol important în controlul diferențierii cardiomiocitelor revine şi micro ARN. miR-1-1 şi miR-1-2 sunt puternic conservați în evoluție şi exprimați specific la nivelul progenitorilor mușchilor cardiac şi scheletici. miR-1-1 este exprimat inițial în atrii şi apoi în întregul cord, în timp ce miR-1-2 este exprimat specific în ventricule. Expresia lor depinde de SRF (*„serum response factor"*) şi de factorii de transcripție miogenici MyoD şi Mef2. miR-1 promovează diferențierea cardiomiocitelor în timp ce miR-133 inhibă diferențierea şi promovează proliferarea. Aceste efecte sunt realizate prin controlul posttranslațional al genei *HAND2*, principala lor țintă.

O altă etapă importantă în dezvoltarea cordului este *separarea celor patru camere*, realizată prin dezvoltarea

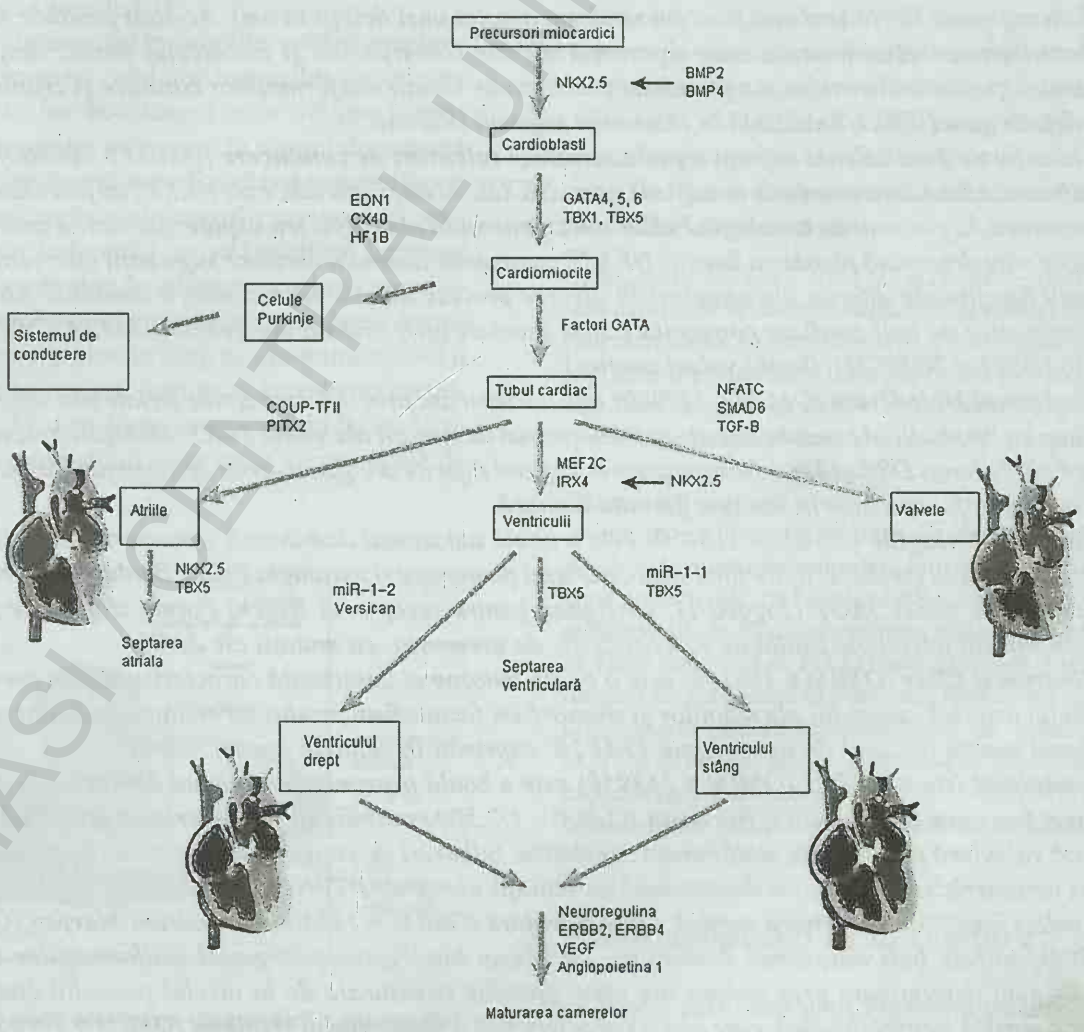


Figura 15.8. Controlul genetic al dezvoltării cordului
(adaptat după Srivastava *et al.*, 2000 şi 2006)

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

septurilor interatrial, interventricular şi formarea valvelor.

Mediatori majori ai procesului de dezvoltare a septurilor interatrial şi interventricular sunt factorii de transcripţie NKX2.5, TBX5 şi GATA4. Modificarea unuia din ei sau a interacţiunilor lor în procesul normal de septare cardiacă duce la defecte septale atriale sau ventriculare (vezi caseta 15.5). Aceste defecte pot să apară şi prin mutaţii ale genei *MYH6* (*α-myosin heavy chain*), care este o ţintă directă pentru factorii de transcripţie NKX2.5, TBX5 şi GATA4. Dezvoltarea valvelor atrioventriculare şi ventriculo-arteriale este mediată în parte de membri ai familiei TGF-β, care induc transformarea celulelor endoteliale precursoare în celule mezenchimale, care prin diferenţiere dau naştere ţesutului fibros al valvelor. Alţi mediatori sunt genele *NFATC* (factor nuclear dependent de calcineurină), *SMAD6* (mutaţiile lor determină la şoareci valve îngroşate şi cu aspect gelatinos, asemănătoare cu cele întâlnite în bolile umane) şi *NOTCH1*.

În sfârşit, *separarea circulaţiei sistemice de circulaţia pulmonară* este asigurată în parte pe seama migrării celulelor *crestei neurale cardiace*, care vor separa trunchiul arterial în aortă şi artera pulmonară şi vor da naştere porţiunii conotruncale a septului ventricular.

Celulele crestei neurale au, de asemenea, rol în dezvoltarea *canalului arterial* şi a porţiunilor proximale ale aortei, arterelor subclaviculare, carotide şi pulmonare. Perturbări ale specificării sau migrării celulelor crestei neurale au drept consecinţă anomalii ale acestor regiuni, care constituie circa 30% din toate anomaliile cardiace la om. Printre factorii care controlează migrarea şi

CASETA 15.5

Sindroame genetice asociate cu malformaţii cardiace

Sindromul DiGeorge *sau* ***velo-cardio-facial*** *(OMIM # 188400) este determinat de o microdeleţie de 3 Mb în regiunea 22q11 (cel mai frecvent sindrom asociat unei deleţii la om). Aceasta produce anomalii de dezvoltare a crestei neurale, care determină defecte conotruncale şi ale arcului aortic, despicătură palatină, hipoplazia timusului şi a glandelor paratiroide. Cauza malformaţiilor cardiace şi craniofaciale este deleţia genei TBX1 localizată în interiorul regiunii deletate.*

Multe forme familiale de ***defecte septale atriale şi tulburări de conducere*** *(OMIM # 108900) au fost identificate ca fiind determinate de mutaţii ale genei NKX2E. Mutaţii sporadice ale NKX2E au fost identificate, de asemenea, la pacienţi cu* ***tetralogie Fallot*** *sau cu* ***anomalii ale valvei tricuspide****. Asocierea unor mutaţii specifice care determină pierderea funcţiei NKX2E cu anumite anomalii cardiace sugerează intervenţia unor domenii funcţionale diferite ale proteinei în diverse procese din cursul dezvoltării cordului. Alte forme nonsindromice de boli cardiace congenitale sunt asociate unor mutaţii ale genelor GATA4 (DSA, DSV), MYH6 (DSA) şi NOTCH1 (boala valvei aortice).*

Sindromul Holt-Oram *(OMIM # 142900) este caracterizat prin defecte septale atriale sau ventriculare asociate cu anomalii ale membrelor şi este determinat de mutaţii ale genei TBX5. Mutaţiile responsabile pentru producerea DSA şi DSV sunt grupate în regiuni diferite ale genei, ceea ce sugerează asocierea în aval a unor cofactori diferiţi, cu specificitate tisulară.*

Sindromul Alagille *(OMIM # 118450) este o boală autozomal dominantă, caracterizată prin atrezie biliară şi anomalii cardiace, tipice fiind stenoza arterei pulmonare şi tetralogia Fallot. Boala este determinată de mutaţii ale genei JAG1 (Jagged-1), un ligand pentru receptorul Notch. Forme izolate de stenoză pulmonară sau tetralogie Fallot au fost asociate, de asemenea, cu mutaţii ale JAG1.*

Sindromul Char *(OMIM # 169100) este o boală autozomal dominantă caracterizată prin persistenţa canalului arterial, anomalii ale mâinilor şi dismorfism facial. Este produs de mutaţii dominant negative ale genei pentru factorul de transcripţie TFAP2B, exprimat în celulele crestei neurale.*

Sindromul Noonan tip 1 *(OMIM # 163950) este o boală transmisă autozomal dominant (una dintre cele mai frecvente boli genetice, frecventa 1:1.000 – 1:2.500 nou-născuţi) caracterizată prin hipostatură, stenoză valvulară pulmonară, malformaţii scheletice, tulburări de coagulare a sângelui, retard mental şi facies caracteristic. Boala este determinată de mutaţii ale genei PTPN11 (cromozomul 12q24.1).*

Analiza familiilor cu ***stenoza aortică supravalvulară*** *(OMIM # 185500) şi* ***sindrom Marfan*** *(OMIM # 154700), ambele boli autozomal dominante, au uşurat înţelegerea patogeniei malformaţiilor aortice. Ambele sunt determinate prin mutaţii ale unor proteine structurale de la nivelul ţesutului conjunctiv. Stenoza aortică supravalvulară, care este o caracteristică a* ***sindromului Williams*** *(OMIM # 194050), este determinată de mutaţii ale elastinei, în timp ce sindromul Marfan, caracterizat prin dilatarea anevrismală a aortei ascendente, este determinat de mutaţii ale fibrilinei 1.*

BCU Cluj / UNIVERSITY LIBRARY

dezvoltarea celulelor crestei neurale se numără *endotelina 1* (*EDN1*) şi receptorul său tip A, precum şi *neuropilina 1*. Dezvoltarea arcului aortic IV care va conduce la formarea crosei aortice, se află sub controlul factorilor de transcripţie MFH1 şi PAX3 şi a receptorilor pentru acidul retinoic, în timp ce factorul de transcripţie TFAP2β controlează dezvoltarea arcului aortic VI care dă naştere canalului arterial.

2.2.3. Dezvoltarea membrelor

Anomaliile membrelor sunt pe locul doi ca frecvenţă după anomaliile cardiace. Studiul sindroamelor care asociază anomalii de dezvoltare a membrelor, ca şi posibilităţile mai facile de studiu experimental au permis identificarea a numeroase gene care controlează dezvoltarea membrelor (caseta 15.6).

Originea membrelor este la nivelul unor muguri care iau naştere în mezodermul plăcii laterale şi mezodermul somitic, care sunt acoperiţi de ectoderm. Aceşti muguri cresc către exterior şi îşi modifică forma, iar celulele care îi alcătuiesc vor da naştere la diferitele ţesuturi componente într-o secvenţă care evoluează în direcţie proximo-distală.

Aspectul fundamental în cadrul dezvoltării membrelor este informarea celulelor mugurilor de origine asupra *poziţiei* lor de-a lungul celor trei axe şi apoi interpretarea acestei informaţii în scopul de a forma structurilor corespunzătoare. Există trei regiuni (figura 15.9) care sunt implicate în semnalizarea poziţiei celulare: *creasta ectodermică apicală* mediază creşterea mugurilor membrelor de-a lungul axei proximo-distale, *ectodermul dorsal* guvernează modelarea dorso-ventrală a membrelor, în timp ce aşa-numita *zonă a activităţii de polarizare* controlează dezvoltarea antero-posterioară. Fiecare dintre aceste regiuni îşi mediază efectul prin intermediul unor clase de molecule de semnalizare.

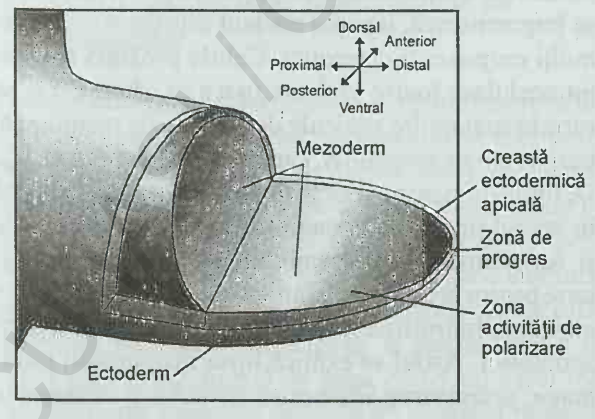


Figura 15.9. Reprezentarea schematică a mugurelui membrelor cu regiunile implicate în semnalizarea poziţiei celulare şi dezvoltarea membrului

(după Jorde, 1999)

Astfel, creasta ectodermală apicală exprimă intens proteine din familia factorilor de creştere fibroblastică: FGF8 şi FGF10 sunt exprimate precoce la acest nivel, în timp ce FGF2, FGF4 şi FGF9 sunt exprimate mai târziu şi doar în porţiunea posterioară a crestei, numită şi *zona de progresie*. De asemeni are loc expresia receptorilor tip 1, 2 şi 3 pentru aceşti factori. Mutaţiile lor sunt implicate în producerea unor sindroame cu anomalii de dezvoltare a membrelor (vezi caseta 15.6).

Anterior de diferenţierea crestei ectodermale apicale, ectodermul dorsal exprimă intens proteina WNT7A, care este responsabilă de dorsalizarea mezodermului vecin.

Principalele componente ale căilor de semnalizare asociate regiunii de polarizare a activităţii sunt acidul retinoic, proteina Shh (*Sonic hedgehog*) şi proteinele din familia BMP, în particular BMP2, BMP4 şi BMP7. Un antagonist al BMP este proteina Noggin.

Toate aceste componente ale căilor de semnalizare sunt coordonate între ele, astfel încât asigură dezvoltarea corectă a segmentelor membrelor de-a lungul celor trei axe. Ca urmare a acestor semnale de poziţionare este indusă expresia spaţială şi temporală, caracteristică, a unor gene care sunt responsabile de dezvoltarea propriu-zisă a diferitelor structuri ale membrelor. Cei mai importanţi mediatori sunt genele din familiile *HOX*, *SALL*, *LMX* şi *TBX*, toate codificând factori de transcripţie. Mutaţiile acestor gene au fost descrise în diverse sindroame asociate cu anomalii de dezvoltare ale membrelor.

Astfel, genele *HOXA9 – HOXA13* şi *HOXD9 – HOXD13* sunt exprimate în domenii suprapuse la nivelul mugurilor membrelor, genele din poziţia 5' (vezi specificarea axei antero-posterioare) fiind exprimate mai târziu şi mai distal. Genele din familia *SALL* par a fi implicate specific în modelarea degetelor. *LMX1* este exprimată în mezenchimul dorsal, în timp ce genele din familia *TBX* par a fi implicate în modelarea dezvoltării antero-posterioare. Diferenţierea între membrele superioare şi cele inferioare este controlată prin intermediul unor gene precum cele din familia *TBX – TBX5* este exprimată specific la nivelul membrelor superioare, în timp ce *TBX4* (împreună cu *PITX1*) este exprimată la nivelul membrelor inferioare. O problemă importantă este şi diferenţierea ţesuturilor componente ale membrelor. O primă informaţie asupra mecanismelor implicate este expresia specifică a genei homeobox *MEOX2* la nivelul celulelor care vor da naştere muşchilor membrelor.

3. Rolul apoptozei în dezvoltare

De-a lungul existenţei unui organism multicelular, celulele se nasc şi mor. Ocazional, moartea unei celule este rezultatul alterării lor accidentale ireversibile (**necroză**) determinate de ischemie sau factori fizici

CASETA 15.6

Cauze genetice ale malformațiilor membrelor la om

***Acondroplazia** (OMIM # 100800) este o boală caracterizată prin hipostatură disproporționată și macrocefalie. Majoritatea pacienților prezintă o substituție glicină-arginină la nivelul domeniului transmembranar al FGFR3. Mutațiile FGFR1 și FGFR2 sunt implicate de asemeni în producerea **sindroamelor Pfeiffer** (OMIM 101600: hipertrofia primului deget, hipertelorism), **Apert** (OMIM# 101200: fuziuni ale degetelor, hipoplazia etajului mijlociu al feței) și **Jackson-Weiss** (OMIM # 123150: hipoplazia etajului mijlociu al feței, anomalii ale piciorului).*

*Mutațiile GLI3, care codifică un factor de transcripție cu degete de zinc (ce acționează asupra genelor țintă a căii de semnalizare Hedgehog) sunt implicate în producerea **sindroamelor Greig** (OMIM # 175700: anomalii craniene și sindactilie) și **Pallister-Hall** (OMIM# 146510: asocierea hamartoblastoame hipotalamice, hipopituitarism, imperforație anală și polidactilie postaxială).*

*Mutațiile genei HOXA13 sunt implicate în producerea **sindromului mână-picior-organe genitale** (OMIM # 140000) caracterizat prin mâini și picioare scurte, cu scurtarea primului metacarpian și metatarsian, clinodactilia degetului 5 și fuziuni ale unor oase metacarpiene, la care se adaugă la femei anomalii ale organelor genitale, precum sept longitudinal vaginal sau uter bicorn. Mutațiile HOXD13 sunt implicate în producerea **sindactiliei tip II** (OMIM # 186000), boală în care heterozigoții prezintă fuziuni ale falangelor și degete supranumerare. Formele homozigote de boală sunt mult mai severe și asociază malformații osoase mai importante ale mâinilor și picioarelor.*

***Sindromul Townes-Brockes** (OMIM # 107480) asociază anomalii ale mâinilor și picioarelor (deget mare trifalangian și alte anomalii osoase), anus imperforat, anomalii ale urechilor și surditate neurosenzorială moderată. Boala este determinată de mutații ale genei care codifică factorul de transcripție SALL1.*

***Sindromul unghii-rotulă** (OMIM # 161200) asociază displazia sau absența unghiilor cu hipoplazia rotuliană la care se poate adaugă uneori nefropatie. Boala este determinată de mutații ale genei LIMX1B.*

*Defecte ale elementelor anterioare și posterioare ale membrelor superioare apar în **sindromul Holt-Oram** (OMIM # 142900) și respectiv **sindromul mamaro-ulnar** (OMIM # 181450). Sindromul Holt-Oram este determinat de mutații ale genei TBX5, în timp ce sindromul mamaro-ulnar este rezultatul mutațiilor genei TBX3, care este strâns înlănțuită și puternic înrudită cu gena TBX5.*

(traumatisme, expunerea la temperaturi extreme). De regulă, în asemenea situații sunt afectate simultan mai multe celule învecinate. Necroza implică alterarea permeabilității membranare, în urma căreia apa pătrunde în celulă, aceasta își mărește volumul până când membrana se rupe. Ulterior, celulele suferă un proces de autodigestie, cu inducerea unui proces de inflamație urmat de acumularea locală de macrofag, care ingeră resturile celulare.

Pe lângă necroză un număr mare de celule sunt selectate să moară în mod natural și deliberat de-a lungul existenței unui organism multicelular. Acest proces numit **moarte celulară programată** (MCP) poate să apară ca o consecință a unor semnale inițiate de către alte celule (de exemplu, în cursul dezvoltării sau ca urmare a proceselor de supraveghere imunitară) sau poate fi declanșat de către sistemele interne de monitorizare atunci când acestea detectează alterarea unor componente celulare vitale, precum ADN sau mitocondriile.

Există mai multe forme de MCP. Printre acestea, **apoptoza**[3] sau MCP tip I este forma cea mai intens studiată și este caracterizată prin modificări foarte specifice ale structurii celulare. Spre deosebire de necroză care afectează grupuri mari de celule, apoptoza interesează de regulă celule individuale. În cursul apoptozei celulele își reduc progresiv volumul, cromatina se condensează la periferia nucleară, ADN se fragmentează, iar apoi nucleul este împărțit în mai mulți *corpusculi cromatici*. Celula prezintă mișcări intracelulare foarte violente (pare că „fierbe") și se rupe în mai multe vezicule delimitate de membrană, numite *corpi apoptotici,* care în final sunt fagocitați. Definitorie pentru apoptoză este menținerea – până în stadiul final al procesului – a integrității structurale și funcționale a citomembranelor, condiție obligatorie pentru prevenirea lezării celulelor vecine de către enzimele hidrolitice conținute în lizozomii corpilor apoptotici. Astfel se explică lipsa răspunsului inflamator, prezervarea arhitecturii țesutului și vindecarea necicatricială.

3. Termenul apoptoză a fost introdus în 1980 pentru a defini ansamblul fenomenelor asociate specific unui program de autodistrugere existent în genomul fiecărei celule.

Apoptoza este un proces crucial în numeroase procese ale dezvoltării organismelor multicelulare şi este de asemenea vital pentru funcţionarea normală a organismelor mature. De exemplu, apoptoza reprezintă modalitatea eliminării populaţiilor celulare din alcătuirea unor structuri embriofetale precursoare care, după ce şi-au încheiat misiunea, urmează a nu mai fi incluse în formaţiunile din care au făcut parte. Exemple ilustrative sunt resorbţia membranelor interdigitale, „sculptarea" cavităţilor, eliminarea organelor şi ţesuturilor tranzitorii (vestigiile filogenetice – pronefros, mezonefros), remodelarea tisulară, distrugerea neuronilor care, din cauza numărului lor excesiv, nu reuşesc să stabilească conexiuni sinaptice. La adult, apoptoza este esenţială pentru menţinerea homeostaziei mitotice şi pentru păstrarea integrităţii organismului[4]. Prin apoptoză mor celulele infectate cu virusuri, cele ale căror genom a suferit leziuni produse de agenţi nocivi ambientali (radiaţii ultraviolete şi ionizante, substanţe chimice), precum şi celulele T autoreactive dotate cu potenţialul de a-şi ataca propriile structuri, care sunt omorâte apoptotic la încheierea răspunsului imun.

O altă formă de MCP este **autofagia** (numită şi MCP tip II), un proces catabolic în care componentele celulare sunt degradate ca o modalitate de a face faţă unor condiţii adverse, precum inaniţia sau infecţia cu anumiţi patogeni intracelulari. În cursul autofagiei, porţiuni largi ale citoplasmei devin delimitate de structuri dublu-membranare numite *autofagozomi*, care fuzionează cu lizozomii. Ca urmare, proteinele şi organitele conţinute în interiorul autofagozomilor sunt degradate. Dacă evoluează la extrem, autofagia poate conduce la moartea celulară.

Pe lângă apoptoză şi autofagie, există şi alte forme de MCP care sunt în prezent intens studiate: necroptoza şi moartea necrotică mediată de PARP1.

3.1. Controlul genetic şi desfăşurarea apoptozei

Primele informaţii referitoare la controlul genetic al apoptozei au fost furnizate de cercetările efectuate pe viermele nematod *Caenorhabditis elegans*. Două dintre aceste gene activează direct decizia „sinuciderii": *ced-3* şi *ced-4* (*ced – cell death defective*). Mutaţiile inactivatoare ale acestor două gene suprimă apoptoza şi conduc la acumularea unui număr excesiv de celule. Acţiunea „sinucigaşă" a genelor *ced-3* şi *ced-4* este antagonizată de gena *ced-9*, al cărei rol este acela de a proteja celulele de moartea programată.

Ulterior, s-a constatat că moartea programată a celulelor umane este rezultatul intervenţiei succesive şi coordonate a unui număr de *proteaze* – în mare măsură similare cu produşii genelor *ced* ale *C. elegans* şi ale căror trăsături comune sunt reprezentate de existenţa cisteinei în situsurile lor active şi specificitatea acţiunii proteolitice exercitate exclusiv la nivelul reziduurilor aspartat ale proteinelor-ţintă. Acestor trăsături li se datorează denumirea de **caspaze** (cysteinyl--aspartic – acid – proteases) care le-a fost atribuită.

Caspazele umane – în număr de 15 – sunt amplu exprimate în toate tipurile celulare, în care se găsesc sub formă de precursori latenţi (procaspaze). Proenzimele inactive sunt alcătuite dintr-un prodomeniu situat la capătul N-terminal, o subunitate mare (~20 kD) şi una mică (~10 kD). După clivare, prodomeniul se elimină, iar subunităţile se heterodimerizează. Familia caspazelor se împarte în două *subgrupuri*: unul care procesează citokinele şi altul implicat în apoptoză. Primul este alcătuit din caspazele 1, 4, 5, 11, 14. Al doilea include caspazele cu rol de *iniţiator* (2, 8, 9, 10) şi pe cele cu rol de *efector* (3, 6, 7). Iniţiatorii au prodomenii N-terminale lungi, care se pot cupla prin intermediul unor molecule-adaptor cu receptorii de suprafaţă – ceea ce le permite să răspundă la stimulii tanatogeni proveniţi din afara celulei. Activarea caspazelor se realizează pe două căi: *extrinsecă* şi *intrinsecă* (vezi şi figura 17.6).

Calea extrinsecă implică activarea *caspazei 8* (şi posibil 10). Această cale este mediată de receptorii familiei TNF (*tumor necrosis factor*) şi NGF (*neuronal growth factor*). Familia include receptorii CD95 (FAS, APO1), TNFR1 şi DR3 (APO3). După cuplarea cu ligandul (FasL în cazul receptorului Fas), receptorii se trimerizează şi recrutează proteine adaptor (FADDD – *Fas receptor associated with death domain*) împreună cu care determină clivarea procaspazei 8. Aceasta va activa efectorii apoptotici (caspazele 3, 6 şi 7), iniţiind apoptoza.

Calea intrinsecă implică eliberarea din mitocondrii a citocromului c şi a AIF (*apoptosis inducing factor*), provocată de semnale tanatogene similare sau diferite de cele primite de receptorii Fas/TNF. Efluxul de citocrom c este mediat de BAX, o proteină formatoare de canale în membranele mitocondriale. Citocromul c citosolic se cuplează cu APAF1 (*apoptotic protease activating factor*) şi determină – în prezenţa ATP – activarea procaspazei 9. Formarea complexului activ – *apoptozomul* (citocrom c, APAF1, caspaza 9) – reprezintă evenimentul declanşator al cascadei caspazelor care se va amplifica rapid clivând variate substraturi enzimatice şi structurale şi realizând astfel dezasamblarea sistematică şi ordonată a celulelor muribunde.

4. În organismul uman adult, în fiecare secundă sunt programate să moară circa 100.000 celule, care sunt înlocuite prin mitoza altor celule.

O altă cale de autodistrugere, utilizată în special de neuroni, este cea care nu recurge la activarea caspazelor, ci la eliberarea – în momentul recepționării semnalului tanatogen – a unei proteine situată în spațiul intermembranar al mitocondriilor, denumită *factorul inductor al apoptozei* (AIF). Proteina AIF migrează în nucleu, unde se leagă la moleculele ADN cărora le produce rupturi bicatenare, incompatibile cu viața.

Țintele caspazelor (peste 200), sunt extrem de variate:

- constituenți ai învelișului nuclear (lamina);
- proteine din alcătuirea citoscheletului (gelsolina, fodrina, actina);
- enzime implicate în perceperea și repararea leziunilor ADN;
- poli(ADP-riboza) polimeraza – PARP – și protein kinaza dependentă de ADN (DNA-PK), ambele proteine sunt implicate în repararea ADN;
- ribonucleoproteina U1 (snRNP70) – ce participă la formarea spliceosomului și eliminarea intronilor;
- factorul DFF (*DNA fragmentation factor*) care mediază clivarea internucleozomală a ADN.

Ca urmare a acțiunii caspazelor, celulele muribunde se detașează de vecinele lor și devin sferice, ceea ce facilitează ingestia lor de către macrofage.

3.2. Reglarea apoptozei

Modularea răspunsului celular la semnalele tanatogene extrinseci sau intrinseci comportă exprimarea diferențială și interacțiunea complexă a unor gene aflate în relații de antagonism: unele conferă rezistență, în timp ce altele cresc susceptibilitatea la apoptoză. În prezent se cunosc 18 gene cu rol pozitiv sau negativ în reglarea programului morții apoptotice a celulelor umane. Ele aparțin *familiei BCL2*[5] și se împart, în funcție de structura și rolurile pe care le îndeplinesc, în trei subgrupuri, dintre care reprezentative sunt *BCL2*, *BCLXL* – cu rol antiapoptotic, *BAX* și *BAK* – stimulatori ai apoptozei, *BID* și *BAD* care sunt, de asemenea, acceleratori ai apoptozei.

Factorii declanșatori ai apoptozei acționează din afara sau din interiorul celulei. Factorii externi sunt reprezentați de stresul oxidativ exogen, ischemia moderată, excitotoxinele (glutamatul, fluxurile ionice), carența factorilor trofici (reducerea gradului de ocupare a receptorilor), stimulii tanatogeni (TNF-alfa1, corticosteroizi) și unele toxine (beta-amiloidul). Factorii interni includ substanțele toxice rezultate din metabolismul celular, formele mutante ale SOD1, stresul celular, creșterea permeabilității membranelor mitocondriale și efluxul subsecvent de citocrom c, cuplarea liganzilor la receptor, activarea caspazelor, exprimarea genelor tanatogene, depleția semnalelor pozitive (NGF, interleukina-2), recepționarea de semnale negative (creșterea nivelului intracelular al oxidanților) și leziunile produse la nivelul moleculelor ADN.

3.3. Apoptoza și patologia umană

Diferite boli umane se asociază cu inhibiția apoptozei sau cu apoptoza excesivă.

- În unele *cancere*, expansiunea populațiilor celulare maligne este consecința, cel puțin în fazele de început, nu a proliferării excesive, ci a *prelungirii duratei de viață* a elementelor componente, devenite refractare la semnalele apoptotice.
- Înlăturarea limfocitelor potențial autoreactive și a surplusului de celule generat în cursul răspunsului imun se realizează prin apoptoză. Dereglările mecanismelor apoptozei și persistența consecutivă în organism a acestor populații limfocitare pot antrena dezvoltarea unor *boli autoimune*.
- Apoptoza reprezintă un mecanism major de apărare a organismului împotriva *infecțiilor virale*. Integrarea proviruşilor în genomul nuclear declanșează semnale apoptotice în urma cărora celulele infectate își activează endonucleazele care vor produce pe lângă clivarea propriului ADN și pe cea a ADN viral. Sinucigându-se, celulele infectate împiedică propagarea virusurilor.
- Rata înaltă a pierderii prin apoptoză a unor seturi specifice de neuroni constituie trăsătura definitorie a unor *boli neurolodegenerative*: boala Alzheimer, scleroza laterală amiotrofică, boală Huntington.

Progresele recente în înțelegerea mecanismelor care guvernează moartea celulară programată creează premisele elaborării într-un viitor nu prea îndepărtat a strategiilor terapeutice prin care să se contracareze factorii determinanți ai inhibiției și excesului apoptozei.

4. Senescența

Senescența sau îmbătrânirea este considerată ultima etapă a procesului complex al dezvoltării tuturor organismelor. Senescența este un proces inexorabil care se referă la o serie de modificări ce determină diminuarea homeostaziei și creșterea vulnerabilității organismului.

5. Protooncogena BCL2 a fost identificată prin clonarea și analiza regiunii cromozomiale 18q21, implicată în translocația t(14;18), prezentă în 85% din limfoamele foliculare cu celule B. În urma translocației, nivelul exprimării genei BCL2 în limfocitele B crește substanțial și acestea se vor sustrage controlului mecanismelor inductoare ale apoptoze, având o durată mare de viață.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În discuţiile despre senescenţă sunt importanţi doi parametri: *durata medie de viaţă* (care se referă la vârstă până la care supravieţuieşte 50% din populaţia studiată) şi *potenţialul maxim de supravieţuire* (care se referă la durata de viaţă maximă a oricărui membru din acea populaţie sau din cadrul speciei). De-a lungul timpului durata medie de viaţă la om a crescut continuu, dar, cu toate acestea potenţialul maxim de supravieţuire rămâne neschimbat. Acesta pare să fie specific fiecărei specii, ceea ce implică intervenţia unei componente genetice importante în controlul ratei de îmbătrânire.

Astfel, studiul fosilelor umane arată că, în urma cu 50.000 de ani, oamenii depăşeau rareori vârsta de 40 de ani. Datorită îmbunătăţirii condiţiilor sanitare care au redus marcant morbiditatea, durata medie de viaţă a depăşit 50 de ani către 1900, iar în prezent este de 67,2 ani (pentru perioada 2005-2010). Durata medie de viaţă variază însă în funcţie de nivelul economic al ţării, fiind în prezent de 82,6 ani în Japonia şi doar de 31,88 ani în Swaziland (în Romania este de 72,5 ani). Durata medie de viaţă este mai crescută la femei decât la bărbaţi, la nivel mondial fiind de 65 de ani pentru bărbaţi şi 69,5 ani pentru femei. Femeia cu cea mai îndelungată supravieţuire documentată a fost Jeanne Calment care a murit în Franţa la vârstă de 122 de ani, în august 1997. Bărbatul cu cea mai îndelungată supravieţuire documentată a fost Cristian Mortensen, care a murit în San Francisco în 1998 la vârsta de 115 ani.

Există mai multe teorii care încearcă să explice mecanismele implicate în procesele de îmbătrânire. Ele pot fi grupate în două mari categorii: teoriile evenimentelor stocastice şi teoriile evoluţionar-genetice. *Teoriile stocastice* consideră senescenţa ca rezultatul unor alterări întâmplătoare ale unor molecule vitale, (precum mutaţiile ADN ori modificările post-translaţionale ale proteinelor) ce determină declinul unor fenomene fiziologice. *Teoriile evoluţionar-genetice* consideră senescenţa drept ultima etapă în cadrul unui program continuu de dezvoltare şi maturare, care începe în momentul formării zigotului şi se finalizează prin decesul individului. Nici una dintre aceste teorii nu este însă capabilă să explice în întregime complexitatea proceselor care au loc în cursul senescenţei. Cel mai probabil, evenimentele genetice sunt dominante în cursul fazei iniţiale a vieţii, pentru ca, ulterior, să domine evenimentele stocastice (figura 15.10).

Din punct de vedere al evoluţiei speciei este necesară asigurarea supravieţuirii până la dobândirea capacităţii reproductive şi, ulterior, a celei de a-şi îngriji urmaşii, până când aceştia ating la rândul lor capacitatea de a procrea. În acest context există trei categorii de gene care ar putea fi implicate în senescenţă: cele care reglează procesele de reparare la nivel somatic, gene cu pleiotropie antagonistă (care îmbunătăţesc supravieţuirea sau reproducerea în faza iniţială a vieţii, dar au efecte dezavantajoase asupra longevităţii – de exemplu, genele implicate în sinteza testosteronului) şi genele specifice fiecărei specii asupra cărora acţionează mutaţii ce apar târziu în cursul vieţii şi pentru care există o presiune evolutivă redusă.

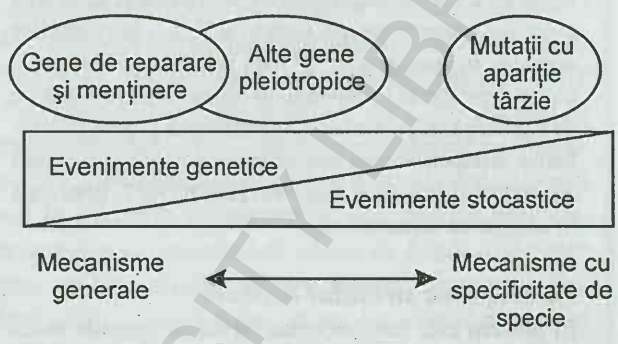


Figura 15.10. Gene şi/sau evenimente care reglează longevitatea şi senescenţa

4.1. Senescenţa celulară

Conceptul de senescenţă celulară a fost fundamentat prin studiile lui Hayflick (1965) pe culturi de fibroblaşti umani. El a observat că după o perioadă iniţială de proliferare intensă, urmează invariabil un declin al capacităţilor de creştere şi proliferare şi, în final o pierdere completă a acestora. Ca urmare, autorul a propus un model conform căruia senescenţa este un fenomen ce are loc nu numai la nivelul întregului organism, ci şi la nivelul fiecărei celule componente; pierderea capacităţilor funcţionale ale individului în cursul îmbătrânirii ar reprezenta suma unor asemenea modificări critice ale celulelor individuale.

Deşi senescenţa celulară poate fi indusă de cauze diverse, celulele senescente sunt caracterizate printr-o serie de trăsături comune care permit identificarea lor. Unele dintre aceste trăsături reflectă activarea unor mecanisme care contribuie la programul senesecenţei celulare.

a). Scurtarea telomerelor şi oprirea ciclului celular

Celulele senescente sunt incapabile de replicare, dar nu mor în mod necesar, ci pot supravieţui perioade îndelungate, chiar ani de zile. Numărul diviziunilor celulare pare să fie fix, datorită existenţei unui mecanism intrinsec de „numărare" a acestora. Acest mecanism de „numărare" a diviziunilor celulare pare să fie strâns corelat cu fenomenul de scurtare a telomerelor cromozomilor (vezi şi capitolul 6.A.2). Odată cu fiecare diviziune celulară, telomerele celulelor care nu au activă telomeraza se scurtează progresiv până la atingerea unei dimensiuni critice care nu mai permite ulterior proliferarea celulară.

Când telomerele ating o lungime minimă critică este declanşată o reacţie de răspuns a ADN (DDR – *DNA damage response*) care implică fosforilarea locală a

histonei H2AX şi acumularea proteinelor 53BP1, NBS1 şi MDC1. Aceste evenimente activează kinazele ATM şi ATR şi ulterior kinazele CHK1 şi CHK2 care fosforilează şi activează anumite componente inhibitorii ale maşinăriei ciclului celular, precum CDC25 şi p53. Pe lângă p53, senescenţa replicativă implică şi activarea proteinei supresoare de tumori RB şi a partenerilor acesteia, în special $p16^{INK4a}$ (un inhibitor al kinazelor ciclin-dependente). Dependenţa senescenţei replicative de scurtarea telomerelor este subliniată şi prin posibilitatea depăşirii acestui mecanism prin expresia ectopică a subunităţii catalitice a telomerazei, hTERT, implicată în elongarea telomerelor.

b). Creşterea stresului oxidativ

În prezent este larg acceptat faptul că speciile reactive de oxigen (ROS – *reactive oxygen species*) – precum radicalul superoxid, peroxidul de hidrogen şi radicalul hidroxil generate la nivelul mitocondriilor – au un rol esenţial în procesul de senescenţă. ROS pot activa, direct sau indirect, p53 şi calea $p16^{INK4a}$-RB. ROS induc de asemenea mutaţii ale ADNmt, care au drept rezultat reducerea treptată a capacităţilor bioenergetice ale celulei. Restricţia calorică sau o serie de agenţi care reduc stresul oxidativ, precum coenzima Q10, tocoferolul, nicotinamida sau acidul ascorbic, s-au dovedit în unele studii epidemiologice a avea efecte benefice asupra longevităţii.

Există numeroase dovezi care atestă acumularea exponenţială, în paralel cu înaintarea în vârstă, a mutaţiilor ADNmt induse de ROS, în special la nivelul muşchilor scheletici, cordului şi creierului. Asemenea mutaţii par să aibă un rol important în patogenia unor boli asociate senescenţei, cum sunt boala Alzheimer, boala Parkinson ori coreea Huntington, precum şi în numeroase miopatii scheletice şi cardiace.

c). Remodelarea cromatinei

Celulele senescente prezintă alterarea structurii cromatinei. Una dintre modificările cele mai caracteristice ale celulelor senescente este apariţia unor *focare heterocromatinice* (SAHF – *senescence-associated heterochomatic foci*) vizibile la examinarea microscopică a celulelor, care au un conţinut crescut în histona metilată H3K9me3. Pe lângă modificările histonelor, celulele senescente prezintă de asemenea modificări ale metilării ADN, cel mai adesea hipometilarea elementelor ADN repetitive şi a promotorilor unor gene care au un conţinut redus în dinucleotide CpG, concomitent cu hipermetilarea promotorilor asociaţi cu insule CpG[6].

d). Produşi secretaţi de celulele senescente

Celulele senescente prezintă modificări majore ale transcriptomului. O consecinţă majoră a acestor modificări este secreţia de către celulele senescente a unui număr crescut de citokine şi chemokine, similare celor induse de un răspuns inflamator. Aceasta conduce la apariţia aşa-numitului fenotip secretor asociat senescenţei (*SASP – senescente-associated secretory phenotype*). Citokinele secretate de celulele senescente par a fi importante pentru menţinerea statusului de senescenţă a celulelor. Pe de altă parte, aceste citokine pot declanşa diverse răspunsuri celulare, inclusiv efecte pro-oncogenice, explicând probabil în parte riscul crescut pentru dezvoltarea cancerelor la vârstnici.

e). Activarea autofagiei

Există dovezi tot mai convingătoare care subliniază o legătură directă între senescenţă şi activarea autofagiei. Autofagia este un proces catalitic care constă în formarea unor structuri dublu-membranare (autofagozomi) care delimitează porţiuni ale citoplasmei ce sunt ulterior fuzionate cu lizozomii, rezultând degradarea conţinutului lor. Autofagia contribuie la blocarea ciclului celular şi la secreţia de interleukine asociate senescenţei.

f). Modificări morfologice

Pe lângă toate modificările funcţionale prezentate mai sus, celulele senescente suferă şi o serie de modificări morfologice, care sunt uneori foarte importante. Astfel, celulele senescente pot fi mai voluminoase, pot deveni multinucleate, îşi pot schimba forma (pot deveni plate, stelate etc.) şi capătă uneori un aspect vacuolizat (reflectând stresul reticulului endoplasmatic).

4.2. Genele longevităţii

Aşa cum am precizat deja, există numeroase dovezi că durata maximă de supravieţuire a fiecărei specii este sub control genetic. Cu toate acestea, heritabilitatea nu depăşeşte probabil 35%. În pofida acestei ponderi relativ reduse a factorilor genetici, o serie de mutaţii pot afecta dramatic procesul de senescenţă.

> Studiile efectuate pe organisme inferioare au permis identificarea unor asemenea gene ale longevităţii. Ele acţionează pe diferite căi, precum modularea răspunsului la stres, a statusului nutriţional, creşterea capacităţii metabolice sau atenuarea genelor care promovează îmbătrânirea. Mutaţii experimentale ale unor asemenea gene au permis modificarea considerabilă a duratei de viaţă la aceste specii.

Studiile efectuate la mamifere au permis identificarea unor gene ale sistemului imunitar sau care reglează dezvoltarea glandei hipofizare drept determinanţi ai

6. Interesant, modificări similare ale metilării ADN sunt întâlnite în cancer, boală asociată frecvent vârstei înaintate.

CASETA 15.7

Sindroame genetice cu îmbătrânire accelerată

Sindromul *Hutchinson-Gilford* *(OMIM # 176670) este o afecţiune extrem de rară, transmisă autozomal recesiv, în care manifestările caracteristice îmbătrânirii precoce încep să se dezvolte la câţiva ani de la naştere. Acestea includ ridarea tegumentelor, tulburări de creştere şi ateroscleroză avansată, care determină adeseori decesul prin infarct miocardic în jurul vârstei de 30 de ani. Boala este determinată de o mutaţie punctiformă în poziţia 1824 a genei LMNA (ce codifică lamina A) care înlocuieşte C cu T, conducând la formarea unei proteine instabile. Lamina A face parte dintre proteinele care alcătuiesc membrana nucleară.*

Sindromul Werner *(OMIM # 277700) este o afecţiune rară transmisă autozomal recesiv, în care pacienţii dezvoltă prematur ateroscleroză, cataractă, intoleranţă la glucoză, osteoporoză, încărunţire precoce, calviţie, atrofie cutanată şi menopauză, la femei. Cu toate acestea, ei nu suferă de obicei de boală Alzheimer sau de hipertensiune arterială. Pacienţii au de asemeni un risc crescut pentru dezvoltarea tumorilor sarcomatoase şi dezvoltă cataractă pe suprafaţa posterioară a cristalinului, şi nu la nivelul nucleului pulpos, cum se întâlneşte în mod normal la vârstnici. Se asociază şi atrofie laringiană şi ulceraţii ale tegumentelor la nivelul antebraţelor şi picioarelor. Majoritatea pacienţilor decedează înaintea vârstei de 50 de ani. Gena WRN responsabilă de producerea sindromului Werner (de pe cromozomul 8p11-12) codifică o helicază implicată în replicarea şi repararea ADN. Celulele pacienţilor cu sindrom Werner prezintă instabilitate cromozomială şi rate crescute ale mutaţiilor genice şi ale recombinărilor cromozomiale nonomoloage.*

longevităţii. În plus, o serie de studii epidemiologice la om au permis asocierea unor variante alelice ale unor gene cu prelungirea supravieţuirii. Printre acestea se numără alela ε2 a apolipoproteinei E, precum şi unele polimorfisme SNP ale genelor *FOXO3A*, *MTP*, *APOC3*, *IGFIR* şi *hTERT*, care au fost găsite mai frecvent la „centenarieni". O altă dovadă pentru contribuţia genetică în determinismul longevităţii o constituie asocierea familială a indivizilor cu supravieţuire îndelungată; studiile de înlănţuire efectuate în asemenea familii au permis identificarea unui locus la nivelul cromozomului 4 care este asociat în longevitatea excepţională.

Există studii care atestă existenţa unei asocieri între anumite variante ale ADNmt şi longevitate. Astfel, aşa-numitul haplotip „J" a fost găsit într-un procent semnificativ mai mare la cei ce trăiesc peste 100 de ani comparativ cu subiecţii tineri. Acelaşi haplotip mitocondrial pare însă – paradoxal – a fi asociat şi unor boli multifactoriale, ceea ce a condus la ipoteza efectului pleiotropic antagonist al unor gene care exercită efecte defavorabile la indivizii tineri, dar asigură o mai bună sănătate la vârste înaintate. Dată fiind transmiterea exclusiv maternă a ADNmt, în prezent se derulează studii care testează ipoteza determinismului matern al longevităţii.

Deşi nu există nici o boală genetică care să reprezinte o fenocopie exactă a îmbătrânirii normale, sunt cunoscute câteva sindroame – precum *Hutchinson-Gilford* (progeria „clasică" sau „a copilului"), *sindromul Werner* (progeria „adultului") ori sindromul Down (trizomia 21) care prezintă unele caracteristici de îmbătrânire accelerată (vezi caseta 15.7).

B. Anomaliile congenitale

De la concepţie şi până la naştere se pot produce la embrion şi făt diferite defecte morfologice, funcţionale şi biochimice. Ele sunt reunite într-un grup patologic foarte larg, denumit *defecte congenitale* („*birth defects*"). Termenul *congenital* semnifică „*prezent la naştere*", indiferent dacă defectul este vizibil, identificat sau nu în această perioadă (OMS, 1972). Categoria defectelor congenitale cuprinde: bolile genetice (inclusiv erorile înnăscute de metabolism), anomaliile congenitale (ca defecte morfologice), întârzierea idiopatică a creşterii intrauterine, fetopatiile, tumorile congenitale etc.

Anomaliile congenitale sunt modificări *morfologice* (structurale) ale unui organ, ale unei părţi de organ sau a unei regiuni anatomice, produse de tulburări de *dezvoltare prenatală* (erori de morfogeneză), *prezente la naştere*, evidente (depistate) sau nu în această perioadă. Anomaliile congenitale sunt cauze frecvente de morbiditate şi mortalitate, în special în copilărie. Datorită incidenţei ridicate (3-5% dintre nou-născuţi), a consecinţelor deseori grave şi posibilităţilor reale de profilaxie, *anomaliile congenitale sunt o problemă majoră de sănătate publică*. În acest context, este util de precizat că 25% dintre copiii cu

anomalii congenitale decedează (majoritatea în primul an de viață), un sfert dintre ei vor avea un handicap fizic sau psihic major, iar restul (50%) au un prognostic bun, după intervențiile chirurgicale „reparatorii".

Abordarea practică eficace a anomaliilor congenitale implică *prevenția* și *diagnosticul* lor precoce (prenatal sau neonatal), corect și complet. Ambele acțiuni necesită însă cunoștințe etiopatogenice, abilitate clinică și mijloace adecvate de explorare.

1. Clasificarea anomaliilor congenitale

1.1. Clasificarea patogenică

Anomaliile congenitale se clasifică după *natura erorii de morfogeneză* în patru tipuri: malformații, disrupții, deformații și displazii congenitale (Spranger, 1982).

a). Malformațiile congenitale

Malformațiile congenitale[7] sunt anomalii produse printr-un proces *primar, intrinsec și precoce* de dezvoltare (morfogeneză) anormală (de exemplu, despicăturile labio-maxilo-palatine). Organul nu se dezvoltă normal (dar țesuturile componente sunt normale) fie datorită unei *diferențieri incomplete*[8] (procesul de morfogeneză nu se efectuează corect; de exemplu, DSV, sindactilia etc.), fie datorită unei *diferențieri anormale* (morfogeneza decurge anormal; de exemplu, polidactilia).

Malformațiile congenitale se produc *precoce* în cursul dezvoltării embrionare (15-60 de zile[9]) („*embriopatii*") și pot fi izolate (unice sau complexe) – implicând un singur organ – sau multiple, afectând cel puțin două organe diferite. Foarte rar ele se produc în perioada fetală (de exemplu, despicăturile palatine) sau perinatală (de exemplu, persistența canalului arterial). În funcție de consecințele medicale și sociale sau cosmetice, malformațiile pot fi majore (2-3% nou-născuți) sau minore.

b). Disrupțiile congenitale

Acestea sunt anomalii produse prin distrugerea *secundară, extrinsecă și tardivă* (fetopatii) a unei structuri fetale *formată normal* (de exemplu, amputațiile digitale, atreziile intestinale). Procesele distructive produc modificări de formă și configurație, diviziuni sau fuziuni neobișnuite, pierderi ale unor părți componente (de exemplu, amputații ale membrelor prin bride amniotice).

Disrupțiile sunt determinate de *agenți extrinseci* – ischemie, infecții, forțe mecanice (bride amniotice) – care distrug structuri embrionare normale, prin compresie și/sau necroză (consecutivă/e unor tromboze, embolii, compresiuni). Prin definiție, o disrupție nu este genetică deși uneori factorii genetici pot predispune la evenimente disruptive (de exemplu, defecte ale colagenului care reduc rezistența amniosului și îl fac mai vulnerabil la rupturi spontane).

După naștere, este dificil de stabilit dacă o anumită anomalie congenitală este o malformație („primară") sau o disrupție („secundară"); de exemplu, cataracta congenitală poate fi o malformație – produsă de mutații diferite – sau o disrupție, produsă de agenți teratogeni. De obicei, disrupțiile se exprimă prin anomalii congenitale multiple.

c). Deformațiile congenitale

Deformațiile congenitale sunt *anomalii de formă sau poziție* a unei părți a corpului, produse prin compresia și deformarea unei regiuni *formate normal* ca morfologie și structură (fetopatie) (de exemplu, piciorul strâmb congenital). Deformațiile interesează sistemul musculo-scheletic[10] și produc pierderea simetriei, alterarea alinierii, distorsionarea configurației și poziția anormală a unor structuri; ele sunt determinate de factori multipli care produc *limitarea spațiului* uterin și/sau *inabilitatea de mișcare* (uter mic/malformat, făt mare sau sarcină gemelară, oligohidramnios). De obicei, compresia este *extrinsecă* (de exemplu, picior strâmb prin oligohidramnios), dar, mai rar, cauzele pot fi *intrinseci* (imobilitate fetală prin anomalii ale SNC sau boli musculare; de exemplu, picior strâmb prin meningocel). În această situație se asociază frecvent, dar neobligatoriu, cu *artrogripoza*. Spre deosebire de malformații și disrupții, deformațiile pot fi *reversibile* (dacă încetează compresia), spontan sau după manevre ortopedice.

d). Displaziile congenitale

Displaziile congenitale sunt anomalii congenitale determinate de *organizarea celulară anormală a unui țesut* (dishistiogeneză) ce produce modificări structurale. De obicei, efectele displaziei se observă în toate

7. De remarcat că termenul de „malformații congenitale" este mai restrictiv, mai limitat, decât cel de anomalii congenitale.
8. Morfogeneza incompletă interesează procesele de: *închidere* (despicăturile), *separare* (sindactilia), *septare* (DSA, DSV), *migrare* (extrofia de cloacă), *rotație* (malrotația intestinală), *rezorbție* (atrezia coanală, diverticulul Meckel). În această categorie se includ și *agenezia* (absența unui mugure embrionar), *aplazia sau hipoplazia* (dezvoltarea/diferențierea incompletă a unui mugure embrionar).
9. Pentru cele mai multe structuri organogeneza se încheie la 8 săptămâni după fecundare (excepție fac creierul, organele genitale externe, dinții).
10. Deformațiile nu implică defecte tisulare, dar țesuturile cu structură anormală sunt mai susceptibile la deformare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

structurile corpului în care se găseşte ţesutul respectiv. De exemplu, displaziile scheletice interesează frecvent toate piesele osoase, iar displaziile ectodermale afectează toate ţesuturile de origine ectodermică: piele, păr, unghii, dinţi. Displaziile sunt determinate de obicei de mutaţii monogenice şi au deci un risc mare de recurenţă.

Clasificarea anomaliilor congenitale în una din cele patru categorii patogenice este importantă pentru *evaluarea corectă a prognosticului* (malformaţiile şi disrupţiile sunt ireversibile, se corectează numai chirurgical şi au o mortalitate ridicată; în schimb, majoritatea deformaţiilor sunt reversibile, se corectează spontan), precum şi pentru *stabilirea riscului genetic* de recurenţă (malformaţiile unice au un risc mic, de circa 3%; disrupţiile sau deformaţiile produse de agenţi externi au un risc practic nul dacă se corijează cauza; în schimb, displaziile, fiind determinate monogenic, au un risc mare de recurenţă).

Din păcate, nu este întotdeauna posibilă încadrarea unei anomalii congenitale în una din cele patru categorii specifice, acestea putând a avea diferite grade de suprapunere:

- unele anomaliile congenitale pot fi, în funcţie de natura agentului iniţiator, malformaţii sau deformaţii; de exemplu secvenţa Pierre-Robin este malformativă în trisomia 18 şi deformativă, prin compresie mecanică extrinsecă; aplazia radială poate fi o malformaţie (asociată cu anomalii cardiace în cazul sindromului Holt-Oram, produs de mutaţia genei *TBX5*) sau o disrupţie, cauzată de talidomidă;
- un acelaşi mecanism (de exemplu, ruptura amniotică) poate da anomalii congenitale diferite: malformaţii (despicătură palatină) sau disrupţii (amputaţii digitale) – prin bride amniotice – şi picior strâmb, prin oligohidramnios;
- o malformaţie poate produce secundar deformaţii (de exemplu, meningomielocelul se poate asocia cu piciorul strâmb congenital).

Atunci când nu se poate face distincţia între diferite categorii (de exemplu, între malformaţii şi disrupţii) sau nu se poate stabili exact tipul de anomalie se preferă termenul mai larg de anomalii congenitale.

1.2. Clasificarea clinică

Clasificarea anomaliilor congenitale după manifestarea clinică este foarte importantă pentru un diagnostic corect şi complet. În funcţie de numărul şi tipul erorilor ce se produc în morfogeneză, se deosebesc anomalii congenitale izolate şi multiple (vezi şi subcapitolul 10.A.5.5).

a). Anomaliile congenitale izolate

Anomaliile congenitale izolate (simple, localizate) se produc printr-o eroare unică, localizată în morfogeneza unui *câmp (unitate) de dezvoltare embrionară* (monotopic – când generează mai multe structuri adiacente, vecine – sau politopic – când produc structuri multiple, situate la distanţă unele de altele). Ele se împart în două categorii: *defecte de câmp de dezvoltare*[11] şi *secvenţe*.

- *Defectele de câmp monotopic* includ anomaliile congenitale *unice* (o singură manifestare, de exemplu DSV), precum şi anomaliile congenitale *complexe* (mai multe anomalii într-un organ; de exemplu DSA+DSV sau tetralogia Fallot etc.).
- *Defectele de câmp politopic* sunt anomalii congenitale multiple ce derivă totuşi dintr-un singur câmp de dezvoltare; de exemplu, defectele arcurilor branhiale 1 şi 2 produc sindromul facio-auriculo-vertebral, iar defectele arcurilor branhiale 3 şi 4 determină sindromul velo-cardio-facial (ce include şi varianta DiGeorge); alte exemple sunt holoprozencefalia (vezi caseta 15.1), neurocristopatiile (vezi caseta 15.4) etc.
- *Secvenţele* sunt, aparent, anomalii congenitale multiple, dar în aceste cazuri un defect primar determină, în cascadă, anomalii secundare. Secvenţele pot fi malformative, deformative şi disruptive:
  - *secvenţa malformativă* Pierre-Robin se caracterizează prin hipoplazia mandibulei (micrognaţie) care produce secundar ascensionarea poziţiei limbii, împiedicând închiderea palatului şi producând despicătură palatină şi glosoptoză;
  - *secvenţa deformativă* Potter este determinată de oligohidramniosul produs fie prin pierderea cronică de lichid amniotic, fie printr-o malformaţie urinară; acesta conduce secundar la o compresie fetală – cu dismorfie facială, luxaţie congenitală de şold, picior strâmb congenital şi hipoplazie pulmonară;
  - *secvenţa disruptivă* prin benzi amniotice produce amputaţii digitale, despicături faciale bizare, encefalocel asimetric etc.

b). Anomaliile congenitale multiple

Anomaliile congenitale multiple sunt produse prin erori multiple de morfogeneză şi se pot împărţi în trei categorii:

11. Trebuie să arătăm că folosirea noţiunii de câmp de dezvoltare, pentru a explica de ce mai multe malformaţii se întâlnesc împreună, este destul de dificilă şi necesită cunoştinţe solide de topografie embrionară; în plus, nu aduce prea multe clarificări patogenice. Pentru practician, termenii de *malformaţii unice, complexe* şi *secvenţe* sunt suficient de clari şi utili.

BCU IAŞI - FIRST UNIVERSITY LIBRARY

- *Sindroamele plurimalformative,* ce grupează mai multe anomalii congenitale majore şi/sau minore într-un „model clinic" caracteristic, care sunt *produse printr-o etiologie unică* (cunoscută sau presupusă). Un sindrom[12] dismorfic sau plurimalformativ este deci o combinaţie caracteristică de anomalii congenitale majore şi minore *observate împreună*, într-un mod predictibil, la mai mulţi pacienţi din familii diferite şi, uneori, în aceeaşi familie; ele au foarte probabil o cauză sau un mecanism comun de producere. Pe această bază se deosebesc *sindroamele cromozomiale* (sindromul Down), *monogenice* (sindromul Marfan), *teratogene* (sindromul alcoolismului fetal); există şi sindroame care pot fi *„recunoscute clinic"* printr-o combinaţie specifică de semne şi simptome, dar care, pentru moment, rămân neelucidate etiopatogenic. Elementele componente ale unui sindrom sunt nespecifice (pot fi prezente şi în alte sindroame şi pot avea cauze diferite) şi rareori una dintre anomalii duce la diagnostic; *combinaţia este unică, caracteristică*, şi nu părţile sale.
- *Asociaţiile malformative,* în care mai multe malformaţii tind să se întâlnească mai frecvent împreună decât ar rezulta prin „jocul" întâmplării, deci se asociază „nealeatoriu", fără a putea fi (încă) corelate patogenic între ele (precum în cazul sindroamelor). Numele asociaţiilor este adesea un acronim alcătuit prin alăturarea primelor litere ale organelor implicate sau anomaliilor asociate (denumite în limba engleză).
  - Asociaţia VATER reuneşte anomalii Vertebrale, Anale, Traheo-Esofagiene, Renale – dar rareori sunt prezente toate aceste componente; uneori se adaugă malformaţii Cardiace, ale membrelor (Limbs) sau arteră ombilicală unică (Single) astfel că acronimul poate deveni VACTERLS.
  - Asociaţia MURCS constă în asocierea neîntâmplătoare a următoarelor anomalii congenitale, denumite în engleză: Müllerian ducts aplasia, Renal aplasia, Cervicothoracic Somite dysplasia.

Probabil că studiile viitoare vor putea identifica o bază comună pentru asocierile malformative. Un exemplu sugestiv este sindromul CHARGE care era considerat o asociaţie ce include următoarele anomalii, denumite în engleză: Coloboma, Heart disease, Atresia choanae, Retarded growth and development, Genital anomalies; în 2004 s-a descoperit că peste 60% dintre bolnavi au o mutaţie în gena *CHD7* care codifică o *helicază* ce se fixează la ADN.

Delimitarea asociaţiilor într-un grup distinct are şi raţiuni practice: identificarea unei (unor) malformaţii caracteristice asocierii implică căutarea prezenţei celorlalte componente malformative.

- *Anomaliile congenitale multiple* (ACM) sunt rezultatul *combinaţiei întâmplătoare* a unor anomalii cu frecvenţă individuală mare. Dacă nu se poate stabili un diagnostic specific de sindrom sau asociere în cazul unui pacient cu anomalii congenitale multiple, este util a se folosi, simplu, această denumire (de exemplu, ACM ± retard mental), în locul termenului de „sindrom plurimalformativ" atât de des şi impropriu uzitat.

1.3. Clasificarea anomaliilor congenitale după gravitate

Acest tip de clasificare permite evaluarea corectă a prognosticului şi a nivelului îngrijirilor medicale. Se disting: anomalii congenitale *letale* (anencefalia), *majore* (omfalocelul), *medii* (testiculul necoborât) şi *minore* (urechi jos implantate); primele trei categorii mai sunt denumite, împreună, anomalii majore, pentru a fi deosebite de anomaliile minore.

Anomaliile minore[13] nu au consecinţe medicale sau cosmetice serioase pentru pacient şi pot fi considerate variante populaţionale (etnice), familiale sau individuale ale unui caracter normal. Sunt numeroase (peste 60) şi 2/3 interesează capul, faţa şi membrele (tabelul 15.1). Sunt frecvente la nou-născuţi (circa 15% au o anomalie minoră), mai ales la prematuri sau dismaturi (20-35%). Unele anomalii minore dispar în copilărie, ca urmare a creşterii structurilor.

Prezenţa mai multor anomalii minore poate fi însă un *indicator preţios al perturbării nespecifice a morfogenezei* (inclusiv a SNC, în debilitatea mintală idiopatică) şi impun căutarea atentă a unei malformaţii viscerale majore. De altfel, multe sindroame plurimalformative sunt caracterizate prin *combinaţii specifice* de anomalii minore.

2. Cauzele anomaliilor congenitale

Identificarea etiologiei anomaliilor congenitale este un obiectiv important pentru profilaxie şi sfat genetic. Problema nu este de loc simplă deoarece: determinarea cauzelor este dificilă; există o *heterogenitate etiologică*; o anumită malformaţie congenitală poate avea cauze diferite; în circa 50% dintre anomaliile congenitale nu se cunoaşte încă determinismul cauzal.

12. În limba greacă, *syndrome = drum împreună,* de la *syn = împreună, dromos = cursă, drum.*
13. Unii autori (Aashe, 1990) deosebesc anomaliile minore (prevalenţă ≥4%) de variante commune în populaţia generală (prevalenţă ≥4%).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 15.1. Anomaliile minore

CRANIU ŞI SCALP	SINUSURI	– macroglosie	– diastazis al muşchilor drepţi abdominali
– vârtej pilar triplu	– branhial	– microglosie	– hipospadias glandular
– vârtej pilar absent	– preauricular	– uvulă bifidă	– scrot în şal
– sutură metopică evidentă	– pe lobul	– creastă alveolară lată	– apendice vaginal
– fontanelă sagitală	– helical	– micrognaţie	MEMBRE
– fontanelă occipitală	– pilonidal	– piele redundantă pe ceafă	– cubitus valgus
– foramen parietal	FAŢĂ ŞI GÂT	– pterigium coli	– degete conice
– occiput turtit	– sinofris	PIELE	– degete încălecate
– occiput proeminent	– epicantus	– gropiţe pe umăr	– police/haluce lat
– bose frontale	– iris pestriţ	– gropiţe sacrate	– clinodactilie
– sprâncene plate	– fante palpebrale oblice în sus sau în jos	– gropiţe pe alte oase	– unghii hipoplazice
URECHI	– fante palpebrale scurte	– pliu palmar unic	– unghii hiperconvexe
– tubercul darwinian	– hipertelorism	– pliu unic pe degetul V	– spaţii mari între degete la picior
– unghi darwinian	– hipotelorism	– pliu plantar	– calcaneu proeminent
– absenţa plierii helixului	– ptoză	– apendici cutanaţi	
– conca cu punţi	– rădăcina nasului turtită	– hemangioame	
– şanţ pe lobul	– narine antevertate	– nevi	
– creastă pe lobul	– sept nazal lung	– pete hiperpigmentate	
– urechi „pleoştite”	– filtrum scurt/lung	– pete hipopigmentate	
– urechi în cupă	– filtrum neted	TRUNCHI	
– urechi retroversate	– microstomie	– mameloane supranumerare	
– helix îngroşat	– macrostomie	– arteră ombilicală unică	
– helix rulat excesiv	despicătură labială microformă	– hernie ombilicală	
– helix ataşat la scalp	– despicătură gingivală		

Cauzele cunoscute sunt genetice (~45%), negenetice (~5%) şi necunoscute[14], pentru moment (50%). Rezultă că, în mod contrar cu ceea ce se crede, *factorii mediului ambiant au la om o contribuţie mică în producerea anomaliilor congenitale*. Totuşi, cunoaşterea şi identificarea lor are consecinţe practice importante pentru profilaxie.

2.1. Cauzele negenetice

Un agent extern care produce o anomalie congenitală prin interferarea[15] dezvoltării embrionare şi fetale este numit *teratogen*. Efectele potenţiale ale oricărui agent teratogen vor depinde de *natura* lui, de *doză* şi mai ales de *timpul* când a fost administrat în cursul sarcinii. Se ştie că fiecare organ are o perioadă critică, de maximă vulnerabilitate, şi că există un veritabil „orar embrionar” ce corespunde perioadei de formare a organelor (figura 15.11). Un alt factor care influenţează acţiunea teratogenilor îl reprezintă *susceptibilitatea* (reactivitatea) genetică a mamei şi/sau fătului, care explică de ce nu se produc întotdeauna malformaţii după o expunere teratogenă.

Agenţii externi cu risc mare de teratogeneză, cum ar fi talidomida sau virusul rubeolic, pot fi identificaţi uşor. Din nefericire, mulţi teratogeni cu efecte mici (şi posibil acţionând sinergic) sunt mult mai greu de identificat, iar studiile experimentale pe animale nu pot fi extrapolate la om, deoarece fiecare specie are susceptibilităţi diferite.

a. Agenţi biologici

Agenţii biologici sunt reprezentaţi în special de: virusurile rubeolic, citomegalic, herpetic, varicela; de parazitul *Toxoplasma gondii* şi de spirocheta *Treponema pallidum*. Toţi aceştia sunt în mod cert teratogeni, dar efectul lor este variabil (tabelul 15.2). Se apreciază că, global, infecţiile sunt responsabile de circa 2% din anomaliile congenitale. Intervenţia unor posibili agenţi infecţioşi în geneza malformaţiilor congenitale se poate explora prin testul TORCH (de la *Toxoplasmosis; Other* – de exemplu, sifilis; *Rubella; Cytomegalovirus; Herpes*).

14. În acest grup ar putea fi incluse erorile spontane de morfogeneză sau combinaţiile sinergice de teratogeni.
15. Recent, s-au descris şase mecanisme teratogene asociate cu agenţii chimici (şi mai ales medicamentele): antagonişti ai folaţilor, disrupţia celulelor crestei neurale, disrupţie vasculară, disrupţie endocrină, stres oxidativ şi teratogeneză mediată de un receptor sau o enzimă.

BCU "IULIU HAŢIEGANU" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

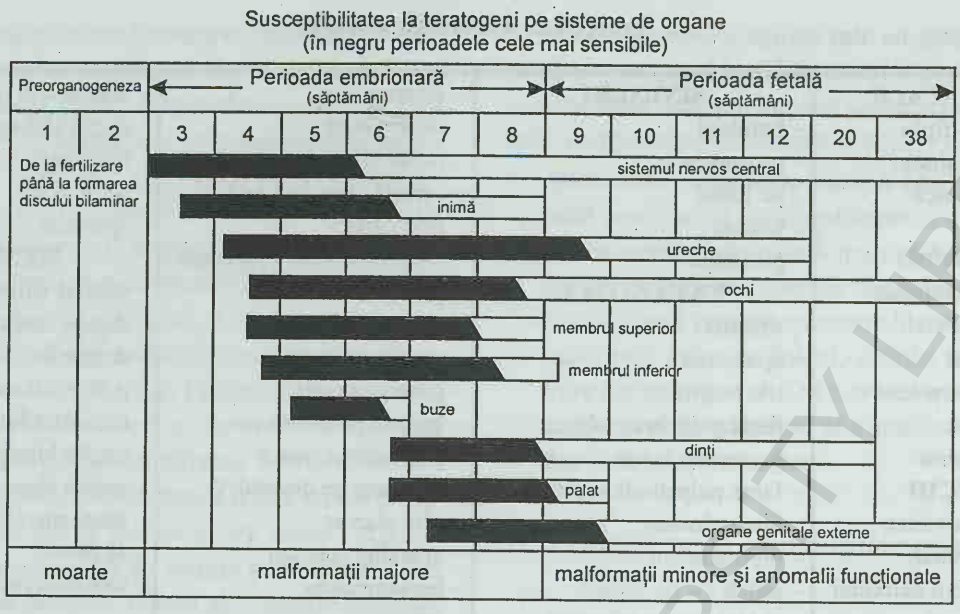


Figura 15.11. Susceptibilitatea la teratogeni pentru diferite sisteme de organe, în funcție de vârste de dezvoltare (perioadele de sensibilitate maximă sunt reprezentate în negru)

Tabelul 15.2. Infecții cu efecte teratogene certe

Infecție	Efecte
Rubeola	Microcefalie, cataractă, retinită, malformații cardiace
Citomegalovirus	Corioretinită, surditate, microcefalie
Herpes simplex	Microcefalie, microftalmie
Varicela zoster	Microcefalie, malformații oculare, digitale, defecte cutanate
Treponema pallidum	Hidrocefalie, osteite
Toxoplasma gondii	Microcefalie/hidrocefalie, cataractă, corioretinită, surditate

Tabelul 15.3. Substanțe chimice/medicamente cu efecte teratogene certe

Medicament	Efecte
Inhibitori ECA	Disgenezie renală, oligohidramnios, defecte de osificare ale craniului
Alcool	Dismorfie craniofacială, malformații cardiace, microcefalie și anomalii ale SNC
Aminopterina	Dismorfie craniofacială, defecte de tub neural, craniosinostoză, malformații ale membrelor
Androgeni/norprogesteron	Masculinizarea organelor genitale externe
Carbamazepina	Spina bifida
Diethilstilbestrol	Malformații uterine, adenocarcinom vaginal, infertilitate masculină
Fluconazol (doze mari)	Malformații craniofaciale și ale membrelor
Hidantoina	Malformații cardiace și digitale
Litium	Malformații cardiace (anomalia Ebstein)
Methotrexat	Craniosinostoză, malformații ale membrelor
Penicilamina	Cutis laxa
Fenitoina	Malformații cardiace, despicătură palatină, hipoplazie digitală
Retinoizi	Hidrocefalie, malformații auriculare și oculare, absența timusului
Streptomicina	Surditate
Tetraciclina	Hipoplazia emailului dentar
Talidomida	Focomelie și alte malformații ale membrelor, malformații cardiace
Acidul valproic	Defecte de tub neural, dismorfie cranio-facială
Warfarina	Hipoplazie nazală, epifize punctate

(Surse: Jorde 2000; Wilson, 2000)

UMF IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

b. Agenţi chimici

Deşi se cunosc peste 50.000 de substanţe chimice, numai 25 s-au dovedit a fi cert teratogene la om şi ele produc circa 2% din toate anomaliile congenitale (tabelul 15.3). Dintre drogurile teratogene citãm: alcoolul, unele anticonvulsivantele (fenitoina, carbamazepina), citostaticele, unele anticoagulante (warfarina), androgenii şi progestinele sintetice, retinoizii, litiul, talidomida etc. Am plasat pe primul loc *alcoolul*, deoarece alcoolismul cronic matern este încă relativ frecvent şi efectele nocive fetale sunt certe (caseta 15.8); după unii autori, alcoolismul fetal este una dintre cauzele majore ale retardului mental şi ale tulburărilor de comportament. Mai subliniem faptul că, deseori, părinţii unui copil cu anomalii congenitale invocă în producerea defectului expuneri din mediul înconjurător, dar ei pot fi asiguraţi că numai un singur agent chimic – mercurul metilic – s-a dovedit a fi teratogen.

c. Agenţi fizici

Agenţii fizici – radiaţiile ionizante în doze mari, hipertermia prelungită şi conformaţia anormală a uterului – pot avea efecte teratogene.

d. Starea mamei

Starea mamei – *fiziologică* (vârsta peste 35 ani, starea de nutriţie, deficitul în folaţi, echilibrul hormonal) sau *patologică* (diabet zaharat, fenilcetonurie, lupus eritematos sistemic, boală Graves) – este implicată în circa 1% dintre anomaliile congenitale.

Deşi numărul agenţilor cert teratogeni este redus, iar contribuţia lor la producerea unor anomalii congenitale este mică (circa 5%), se recomandă ca orice gravidă să cunoască şi să evite în primele 2-3 luni de sarcină orice factor de mediu – biologic, chimic sau fizic – care ar putea interfera morfogeneza normală. Medicii care evaluează un copil cu anomalii congenitale trebuie să acorde o atenţie specială istoricului gestaţional, mai ales în perioada embrionară de producere a defectului observat la pacient.

2.2. Cauzele genetice

Cauzele genetice ale anomaliilor congenitale sunt mult mai numeroase (circa 45%) decât cele ecologice, iar progresele cunoaşterii mecanismelor de control genetic al embriogenezei (vezi subcapitolul 15.A) vor duce cu certitudine la îmbogăţirea cunoştinţelor în acest domeniu.

- *Anomaliile cromozomiale neechilibrate* (trisomii sau monosomii complete sau parţiale) se întâlnesc la circa 6% din anomaliile congenitale, dar foarte probabil aceasta este o subevaluare a fenomenului real, determinată de nivelul tehnicilor folosite.
- *Mutaţiile monogenice* sunt responsabile de aproximativ 7,5% dintre anomaliile congenitale izolate

CASETA 15.8

Sindromul alcoolismului fetal

*Unul dintre cei mai frecvenţi teratogeni la om este consumul excesiv de alcool. Deşi pericolul acestui drog la femeile gravide este cunoscut din antichitate, primul studiu documentat despre alcoolismul fetal apare abia în 1960. Cercetările experimentale pe fetuşi de rozătoare şi primate au demonstrat că alcoolul administrat în cursul sarcinii produce anomalii cerebrale şi microftalmie, a căror gravitate este direct proporţională cu doza şi momentul administrării. La om, consumul cronic de alcool poate afecta sever nou-născuţii – **sindromul alcoolismului fetal** (FAS de la Fetal Alcohol syndrome) – sau **efectul alcoolismului fetal** (FAE de la Fetal Alcohol Effect), care împreună au o incidenţă de 1-2 la 1.000 de nou-născuţi.*

FAS se caracterizează printr-o întârziere a creşterii pre- şi postnatale, microcefalie, facies sugestiv (cu fante palpebrale scurte, rădăcina turtită a nasului, filtrum neted şi scurt, buza superioară subţire şi anomalii ale urechii). La acestea se adaugă inconstant malformaţii cardiace, renale, oculare. Cei mai mulţi copii cu FAS au probleme neuro-comportamentale, incluzând un deficit mental uşor sau moderat (IQ=40-65), dificultăţi de învăţare, hiperactivitate, impulsivitate, deficite neurosenzoriale.

Diagnosticul neonatal este dificil şi numai 50% din bolnavi sunt diagnosticaţi până la 3-4 ani. Nu există un marker biochimic sau molecular al expunerii prenatale la alcool şi numai istoricul gestaţional rămâne o „şansă" de diagnostic care se validează în mai puţin de 40% din cazuri. Anamneza sarcinii este însă dificilă şi necesită o abilitate deosebită: discuţii cu ambii părinţi, evitarea întrebărilor directe, conturarea contextului socioeconomic; mama va fi întrebată repetat (dar abil) dacă a consumat ape minerale carbonatate, bere şi/sau vin (deseori considerate a nu fi „băuturi") şi dacă a fumat în cursul sarcinii.

Multe probleme legate de folosirea dozelor moderate de alcool în sarcină, de predispoziţia genetică la FAS şi criteriile comportamentale de diagnostic nu sunt încă soluţionate, dar este cert faptul că expunerea la alcool în cursul graviditãţii poate fi evitată.

BCU CENTRALA UNIVERSITARĂ

(de exemplu, microcefalia – autozomal recesiv, hidrocefalia prin stenoza apeductului Sylvius – recesiv legat de X; polidactilia sau brahidactilia – autozomal dominant) sau sindromice (de exemplu, sindromul Apert – craniosinostoză, sindactilia – autozomal dominant, sindromul Roberts – focomelie, despicătură labială/palatină – autozomal recesiv).

- Ereditatea multifactorială este implicată în producerea a 20-30% dintre anomaliile congenitale, în special formele izolate, „non-sindromice", ale malformațiilor cardiace (defectul septal atrial, defectul septal ventricular, persistența canalului arterial etc.), ale SNC (anencefalie, encefalocel, spina bifida), ale sistemului genito-urinar (agenezie renală, hipospadias etc.) și altele (despicături labio-maxilo-palatine, luxația congenitală de șold etc.). Anomaliile congenitale multifactoriale au fost tratate pe larg în capitolul 14.C.

Cert este că *la orice pacient cu anomalii congenitale trebuie făcută o evaluare atentă și cât mai completă a cauzelor genetice* (anamneză familială, explorări genetice – vezi capitolul 10.A), deoarece numai pe această bază se poate determina riscul genetic de recurență.

În circa 50% dintre toate anomaliile congenitale nu se poate stabili în mod clar o cauză precisă; aceasta nu înseamnă că nu pot fi implicați factori genetici, ci numai ca ei nu pot fi identificați. Astfel, unele malformații izolate sau sindroame „neexplicabile" pot fi consecința unor mutații noi, a microdeleților submicroscopice sau a disomiei uniparentale (vezi capitolele 11.A.3 și 7.C.1); foarte probabil studiile moleculare vor elucida în curând „enigmele" producerii unui procent mult mai mare de anomalii congenitale. În toate aceste cazuri riscul de recurență este însă foarte mic.

3. Conduita practică în diagnosticul anomaliilor congenitale

Nașterea unui copil cu dismorfii/anomalii congenitale este pentru părinți un șoc, o dramă. De aceea, medicul practician trebuie să dovedească multă compasiune, înțelegere și disponibilitate; el trebuie să rezolve patru probleme: 1) ce are copilul (diagnostic clinic); 2) din ce cauză (diagnostic etiologic); 3) ce se poate face pentru pacient (tratament) și care este prognosticul lui; 4) ce risc există în familie ca la o altă sarcină evenimentul să se repete (sfat genetic). Elucidarea lor presupune un ansamblu de competențe pe care unii medici de familie sau pediatri nu le au. Prin prioritatea abordării patologiei malformative ei sunt însă obligați să dețină informațiile referitoare la modul general de abordare a celor patru probleme, să le rezolve progresiv în limitele lor de competență și să dirijeze cazurile corect spre alți specialiști. Fără a diminua importanța și sarcinile „medicilor din prima linie", este necesară formarea unor specialiști și a unor centre specializate de diagnostic care pot rezolva mai competent problemele de diagnostic și sfat genetic.

Conduita diagnostică se particularizează la fiecare tip de anomalie congenitală, dar credem că se pot aplica câteva reguli generale (detalii în capitolul 10):

1) *Anamneza* (materno-fetală, neonatală și postnatală, familială) va fi detaliată, iar *examenul clinic* se va realiza metodic, minuțios și complet. Se vor examina cu atenție toate segmentele, regiunile și organele, înregistrând orice dismorfie și încercând obiectivarea unor semne (prin măsurători și fotografiere). Este necesară cunoașterea perfectă a normalului și variantelor sale, descrierea precisă a tuturor anomaliilor, minore sau majore, folosind o terminologie adecvată (semiologie malformativă).
2) *Consultarea* altor specialiști („de organ") va precede *investigațiile* paraclinice (imagistice, biochimice, hormonale etc.) și genetice (cromozomiale, moleculare). În final se vor sintetiza și ordona informațiile/rezultatele obținute din diferite surse și se vor analiza pentru a ajunge la un diagnostic corect și complet.
3) *Evaluarea datelor* impune luarea în discuție a unor probleme:
   - anomaliile pacientului (inclusiv hipostatura) au debut *prenatal* sau *postnatal*?
   - pacientul are *una* sau *mai multe* anomalii congenitale, *majore* și/sau *minore*?
   - anomalia/anomaliile pacientului se încadrează în: *malformații, disrupții, deformații sau displazii*?
   - există concomitent o tulburare importantă de creștere (hipostatură, asimetrie), afectare a SNC, visceromegalie, afectare scheletică sau senzorială?
   - în cazul unor *anomalii multiple* se poate identifica *o corelație* între ele (anomalii primare sau secundare, localizate sau sistemice) sau un element patogenic comun (de exemplu, momentul embriologic în care s-au produs)?
   - în care din cele șase categorii diagnostice s-ar putea încadra pacientul: 1) malformație izolată sau secvență malformativă; 2) sindrom malformativ; 3) deformație sau secvență deformativă; 4) disrupție sau secvență disruptivă; 5) displazie sau secvență displazică; 6) asociație malformativă?
   - anomalia poate avea un determinism genetic sau ar putea fi un sindrom teratogen?

4) *Diagnosticul este deseori dificil*, mai ales în cazul anomaliilor congenitale multiple, deoarece există un număr mare de boli, anomalii şi sindroame malformative, greu de recunoscut; în aceste cazuri se va recurge la cărţi, algoritmi (vezi caseta 10.1), chei sau scoruri de diagnostic, baze de date accesibile pe CD (POSSUM, LDDB) sau pe Internet (Orphanet, GeneClinic, OMIM). La aceste dificultăţi se adaugă şi faptul că fenotipul pacientului poate *evolua în timp*, făcând mai dificil diagnosticul la adult (în acest caz „albumul cu fotografii din copilărie" ar putea fi un document foarte util).
   Un *diagnostic corect şi complet cere timp*, nu trebuie să ne grăbim, chiar dacă părinţii sunt nerăbdători. În fond puţine cazuri sunt urgenţe, iar diagnosticul nostru este o „sentinţă" pentru o boală cronică, de „o viaţă". De aceea, medicul trebuie să aibă opinii rezervate după examenul clinic, să explice părinţilor *elementele cert anormale* şi semnificaţia lor şi să-i îndemne la răbdare, pentru analiza completă a cazului.
5) Destul de des *nu se poate pune un diagnostic specific*. Desigur că în aceste situaţii contează experienţa clinică, capacitatea de investigare şi nivelul de informare al medicului, dar în cazul bolilor genetice intervin şi alte motivaţii, în primul rând expresivitatea variabilă a bolii la un anumit moment, precum şi în timp. *Urmărirea* ulterioară a pacientului şi *cunoaşterea* cât mai *completă* a statusului familial se impun cu necesitate în aceste condiţii.
6) Evaluarea diagnostică trebuie să se completeze cu evaluarea *prognosticului*, a capacităţilor de recuperare, precum şi a *riscului* genetic de recurenţă.

Comunicarea datelor este o etapă importantă pentru familia pacientului. Medicul trebuie să explice simplu dar clar ce are pacientul, natura genetică a bolii, evoluţia ei, posibilităţile de recuperare şi eventual de tratament. Deseori, este nevoie de mai multe „şedinţe" şi este foarte bine ca datele să fie comunicate şi în scris. Problema riscului genetic de recurenţă şi a opţiunilor reproductive se va pune de regulă mai târziu.

4. Profilaxia anomaliilor congenitale

Profilaxia primară a anomaliilor congenitale se adresează cauzelor cunoscute, negenetice sau genetice. Deşi factorii teratogeni din mediu au o contribuţie mică (5%) la producerea anomaliilor congenitale, evitarea lor este, în principiu, posibilă. Aceasta presupune o *educaţie sanitară* adecvată a cuplurilor tinere şi o activitate susţinută a *medicilor de familie*.

Concepţia unui copil trebuie să se facă pe baza unui planning familial, de preferat până la 35 de ani, în deplină *stare de sănătate a genitorilor*. Atunci când acest lucru nu este posibil, iar femeia suferă de o boală cronică cu risc teratogen (epilepsie, diabet zaharat insulino-dependent, fenilcetonurie ş.a.), trebuie luate măsuri adecvate pentru a minimiza efectele teratogene potenţiale (modificarea sau reducerea medicaţiei anticonvulsivante, controlul perfect al glicemiei, restricţie alimentară de fenilalanină).

O atenţie deosebită se acordă în prezent unei *suplimentări periconcepţionale cu acid folic* (600-800 μg/zi, o lună înainte de concepţie şi două luni după aceea) care scade incidenţa defectelor de tub neural cu peste 75%.

Vaccinarea antirubeolică sistematică a tinerelor fete şi *evitarea agenţilor infecţioşi teratogeni* în trimestrul I de sarcină ar putea fi măsuri benefice. La acestea se adaugă renunţarea la *fumat*, evitarea *băuturilor alcoolice*, precum şi a administrării neautorizate a oricărui medicament.

În familiile în care există persoane cu anomalii congenitale şi boli genetice, cuplurile tinere vor fi îndrumate spre un medic genetician ce poate stabili mărimea riscului şi posibilităţile reducerii sale. Sfatul genetic este în multe ţări o componentă de rutină a sfatului premarital sau preconcepţional, iar *screening*-ul şi diagnosticul prenatal sunt larg utilizate.

Profilaxia secundară vizează evitarea naşterii unui făt anormal – în special prin diagnostic prenatal (vezi capitolul 19), precum şi depistarea precoce, neonatală, a defectelor congenitale, în scopul prevenirii complicaţiilor şi a realizării unor măsuri medicale adecvate de recuperare.

C. Sexualizarea normală şi patologică

Unul dintre cele mai fascinante subiecte ale biologiei dezvoltării îl reprezintă procesul de sexualizare. El a fost descifrat în mare măsură, reprezentând poate cel mai clar model al geneticii dezvoltării. Cunoştinţele actuale privind mecanismele diferenţierii sexuale sunt importante teoretic şi utile practic pentru diagnosticul corect şi managementul eficace al stărilor intersexuale.

Prin **sexualizare** se înţelege realizarea unui ansamblu de caractere morfologice, funcţionale şi psihocomportamentale care contribuie la formarea şi fecundarea gameţilor, dezvoltarea şi naşterea unui copil. Procesul normal de sexualizare se desfăşoară în mai multe etape, precis coordonate şi reglate genetic şi hormonal (figura 15.12). Prima etapă este stabilirea *sexului genetic* sau cromozomial (XX sau XY), care se realizează în momentul fecundării. Apoi, prin acţiunea unor gene de sexualizare de pe cromozomii X şi Y, dar şi de pe autozomi, au loc o serie de transformări

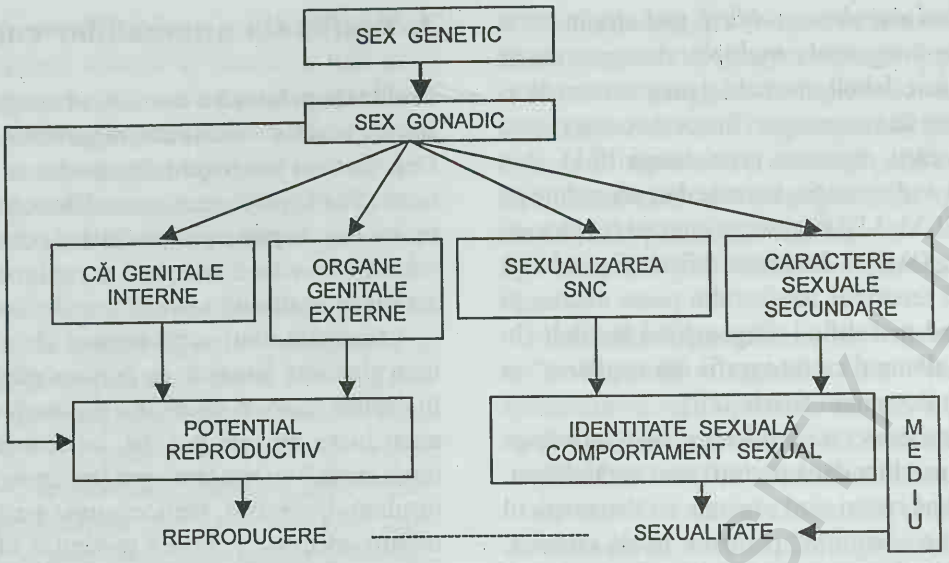


Figura 15.12. Etapele procesului normal de sexualizare

embriologice secvențiale complexe care, schematic, pot fi grupate în două procese distincte și succesive:

- *determinismul sexual* (sau diferențierea sexuală primară) care constă în *formarea gonadelor* printr-o serie de evenimente determinate de sexul genetic;
- *diferențierea sexuală* (sau diferențierea sexuală secundară), care urmează după dezvoltarea gonadelor și duce la formarea *fenotipului sexual*, deci a caracterelor sexuale primare (căile genitale interne, organele genitale externe).

Dezvoltarea sexuală anatomică se încheie în cursul vieții fetale. Cu toate acestea, dobândirea capacităților reproductive necesită o serie de modificări fenotipice suplimentare care au loc în cursul pubertății, sunt dependente de hormonii gonadali și vor avea ca rezultat realizarea *caracterelor sexuale secundare*. În același timp, hormonii gonadali sunt responsabili, încă din cursul vieții intrauterine și ulterior în cursul pubertății, de producerea unor modificări morfologice și funcționale la nivel cerebral, care vor conduce la dobândirea *sexualității* sau *a identității și comportamentului sexual*.

La ambele sexe, toate componentele genitale – de la gonade, la organele genitale externe – se dezvoltă din structuri inițiale ambivalente, *bipotențiale*. Multă vreme s-a considerat că *planul embrionar de bază al sexualizării la mamifere și om este înnăscut și spontan feminin*, dar experimente recente au demonstrat că și sexualizarea feminină, similar celei masculine, este un proces activ ce implică numeroase molecule (factori de transcripție, hormoni, receptori etc.).

Ar mai fi de remarcat faptul că formarea caracterelor sexuale primare determină un potențial reproductiv ce face posibilă reproducerea numai în cadrul unei sexualități normale (figura 14.12); la specia umană **sexualitatea**, ca proces psihocomportamental, *este însă mai importantă decât sexualizarea* morfo-funcțională, deoarece determină o serie de *atitudini și aptitudini* care influențează decisiv viața fiecărui om.

În fine, trebuie să înțelegem că *diferențierea sexuală are un sens mai larg* decât cel definit mai sus, deoarece numeroase fenomene biologice din organism sunt asociate sau influențate de un sex sau altul: de la dezvoltarea embrionară, unele procese metabolice sau formarea și funcționarea unor structuri cerebrale (non-dependente de hormoni), până la ratele diferite ale recombinării sau ale mutațiilor la cele două sexe, sau la fenomenul de amprentare genomică.

1. Embriologia aparatului genital

1.1. Determinismul sexual: formarea gonadelor

Prima etapă a dezvoltării gonadale constă în formarea **gonadelor primitive,** *nediferențiate*; aceste *structuri bipotențiale* au o conformație identică la ambele sexe. Procesul implică parcurgerea a două faze distincte și succesive:

- *formarea primordiilor gonadale* (crestele genitale), în săptămânile 3-4 de gestație, prin condensarea mezodermului situat medial față de mezonefros[16] (precursorul rinichiului) (figura 15.13) și îngroșarea și proliferarea epiteliului celomic, care

16. Dezvoltarea embrionară reno-urinară, mai ales în primele stadii, este strâns corelată cu dezvoltarea genitală, implicând structuri comune și intervenția unor gene ce influențează ambele procese.

BCU LAW / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

pătrunde în mezenchimul subiacent, formând *cordoanele sexuale primare*;

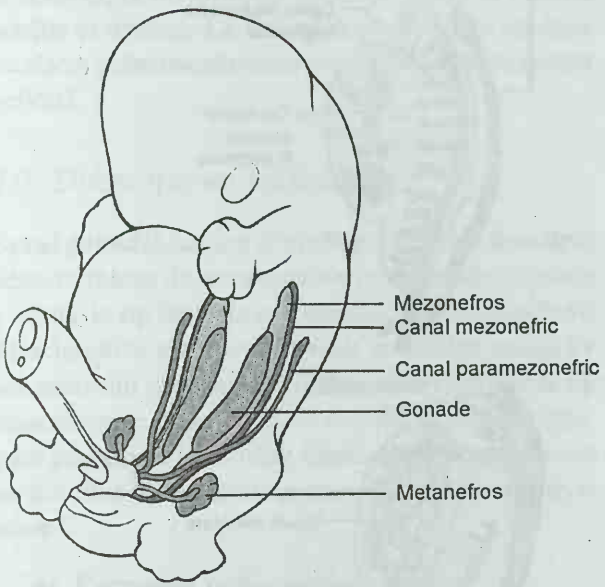


Figura 15.13. Formarea primordiilor (crestelor) genitale
(după Larsen, 1998)

- *formarea şi migrarea celulelor germinale primordiale* (CGP). Acestea se formează, în săptămâna a doua de dezvoltare embrionară, din ectodermul primar al embrionului[17]; apoi, ele se desprind din ectoderm şi migrează, prin mişcări ameboidale, în aria extraembrionară (sacul galben). În săptămâna a patra, CGP încep să migreze înapoi în embrion, prin mezenterul dorsal al intestinului primitiv şi în săptămâna a cincia populează gonada nediferenţiată, unde invadează cordoanele sexuale primare, în curs de formare.

La sfârşitul săptămânii a şasea, **gonadele primitive** sunt formate dintr-un *cortex extern şi o medulară internă*. Ele conţin patru linii celulare (bipotenţiale) care vor evolua diferit la cele două sexe.

Cele patru linii celulare sunt: *1) celulele germinale primordiale (CGP)* – care vor forma spermatogoniile sau ovogoniile; *2) celulele de susţinere a CGP* – care vor genera celulele Sertoli, la embrionul XY, sau celulele foliculare, la embrionul XX; *3) celulele steroidogenice* – care vor produce hormoni sexuali şi vor forma celulele Leydig (la embrionul masculin) sau celulele tecale (la embrionul feminin); *4) celulele conjunctive* – care vor contribui la formarea organului ca întreg, alcătuind celulele mioide peritubulare şi vascularizaţia testiculelor sau celulele stromale în ovare.

Tot în săptămâna a şasea, concomitent cu gonadele primitive, se formează, prin invaginarea epiteliului celomic, canalele paramezonefrice (Mülleriene), care se plasează lateral faţă de canalele excretorii ale mezonefrosului (Wolffiene) şi se unesc prin capetele lor caudale.

După această fază indiferentă sau ambisexuală, din săptămâna a şaptea evoluţia sistemului genital se face pe căi diferite la embrionii XY şi XX. În gonadele primitive sunt exprimate simultan şi precoce genele *FGF9*, *SOX9* şi *WNT4A*. În gonadele XY *factorul de transcripţie codificat de gena SRY* amplifică acţiunea FGF9 şi SOX9, care inhibă WNT4 şi determină formarea testiculelor. Acest proces este rapid şi, la sfârşitul săptămânii a opta, testiculul fetal produce deja hormoni. În gonadele XX proteinele WNT4 şi DAX1 inhibă dezvoltarea structurilor testiculare şi conduc la formarea ovarelor, proces care debutează mult mai tardiv, în săptămâna a zecea de gestaţie.

a). Formarea testiculelor

Primul eveniment observabil în dezvoltarea testiculelor este apariţia *celulelor primordiale Sertoli*. Sub acţiunea proteinei SRY, celulele pre-Sertoli din regiunea medulară a cordoanelor sexuale primitive încep să prolifereze, se adună în jurul celulelor germinale primitive şi se diferenţiază în celule Sertoli (în acest timp partea corticală a cordoanelor sexuale degenerează) (figura 15.14). Celulele Sertoli încep să secrete *hormonul anti-müllerian*[18], o glicoproteină care acţionează paracrin, inducând inhibiţia canalelor Müller şi stimulând, probabil, formarea celulelor Leydig.

Celulele germinale primordiale nu sunt o condiţie necesară pentru dezvoltarea testiculelor, dar izolarea celulelor germinale în cordoane şi contactul direct cu celulele Sertoli le obligă spre *evoluţie spermatogenetică*: multiplicarea mitotică este inhibată şi astfel se previne (până la pubertate) intrarea celulelor germinale în meioză.

În săptămâna a şaptea, celulele Sertoli formează *cordoanele testiculare* (ce vor deveni ulterior tubuli seminiferi); acestea proliferează profund în ţesutul conjunctiv din jur, fuzionează între ele la extremitatea lor distală, formând *rete testis* şi, în final, pierd contactul cu epiteliul de suprafaţă, fiind separate de acesta prin intermediul tunicii *albuginee* (figura 15.14.A).

17. La şoarece formarea CGP în regiunea posterioară a epiblastului este indusă de către proteinele BMP4/BMP8 secretate de celulele ectodermului extraembrionic vecin. Aceste semnale induc expresia proteinelor fragillis şi blimp1 într-un mic număr de celule care vor da naştere eventual CGP.
18. Celulele Sertoli secretă de asemeni inhibina, protejează şi hrănesc celulele germinale, sintetizează un factor de legare a androgenilor şi inhibă meioza în cursul vieţii fetale.

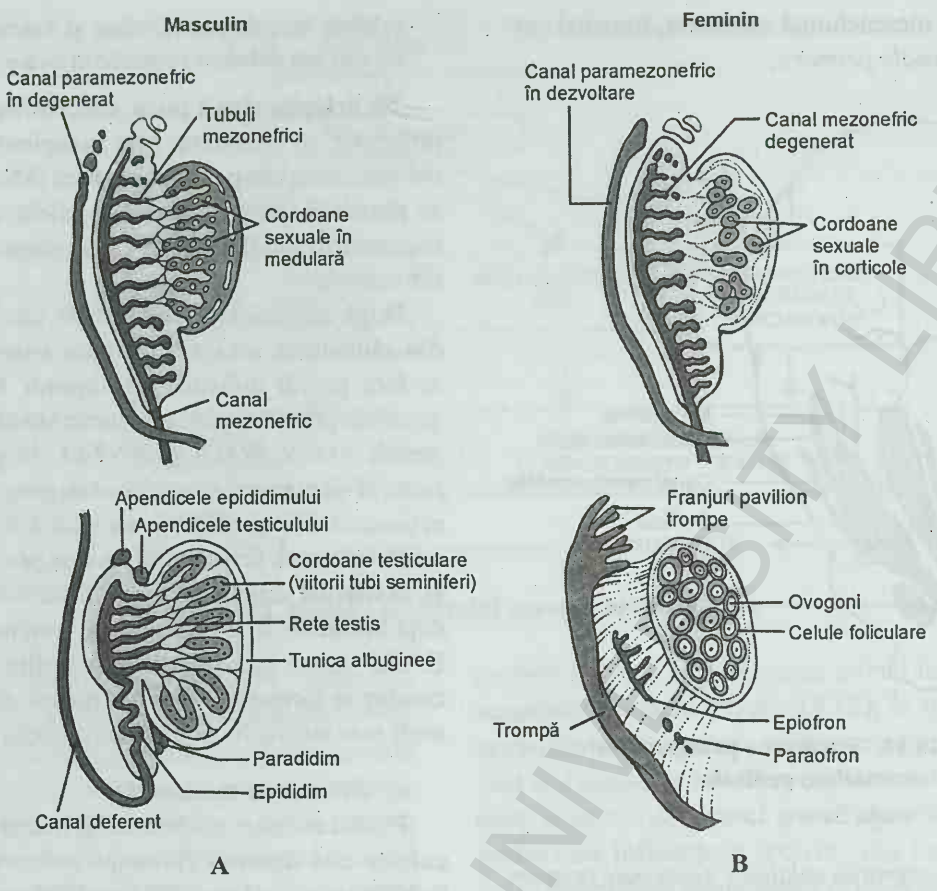


Figura 15.14. Dezvoltarea gonadală la sexul masculin şi feminin
(după Larsen, 1998)

Cordoanele testiculare sunt necanalizate pe tot parcursul vieţii fetale şi până la pubertate. În săptămâna a opta celulele mezenchimale din jurul cordoanelor se diferenţiază în *celulele Leydig* care vor începe sinteza de testosteron. Dezvoltarea testiculelor este completă la sfârşitul săptămânii a opta de gestaţie.

b). Formarea ovarelor

Formarea ovarelor începe tardiv, după săptămâna a 10-a; până atunci, singurul element care caracterizează din punct de vedere morfologic precursorul ovarului este absenţa caracterelor testiculare. Apoi, cordoanele sexuale primare degenerează şi din mezoteliul crestei germinale se formează *cordoanele sexuale corticale secundare* (figura 15.14.B). În săptămâna a 16-a, aceste cordoane se fragmentează în grămezi care înglobează celulele germinale primordiale diploide, diferenţiate în ovogonii, devenind *foliculi primordiali*[19]; celulele epiteliale din jurul celulelor germinale se vor diferenţia în celule granuloase, iar celulele mezenchimale externe devin *celulele tecale*, echivalentul celulelor Leydig.

La fetusul feminin, celulele germinale primordiale *continuă să prolifereze* prin mitoză şi se diferenţiază în ovogonii; apoi (săptămâna 11-12) ele intră în prima diviziune meiotică ca *ovocite primare*. Contactul strâns cu celulele foliculare duce la *oprirea meiozei* (în diploten), până la pubertate. Ovogoniile care nu sunt incluse în foliculi mor prin *apoptoză*. Formarea foliculilor primordiali se termină la 6 luni după naştere. Merită subliniate două aspecte:

- spre deosebire de fetusul XY, la fetusul XX formarea ovarelor este dependentă de prezenţa celulelor germinale; în absenţa lor, gonada nediferenţiată degenerează într-un ţesut nefuncţional, fibros, *„streak gonad"*.
- dezvoltarea ovarelor este cronologic mai tardivă decât a testiculelor, se termină în luna a V-a şi nu influenţează diferenţierea sexuală (care are loc aproape concomitent cu dezvoltarea gonadală) pentru că acestea nu produc hormoni.

În timpul vieţii fetale, testiculele şi ovarele *coboară* din poziţia lor iniţială (de la nivelul vertebrei T10), tractate de un cordon ligamentos numit *gubernaculum*. În săptămânile 12-24, testiculele migrează (prin scurtarea gubernaculumului, sub acţiunea androgenilor şi a unui factor proteic înrudit cu insulina – vezi mai

19. La fetusul de 5 luni există aproximativ 7 milioane de foliculi primordiali; mulţi degenerează însă până la naştere (700.000 – 2.000.000) şi apoi până la pubertate, când rămân numai circa 400.000 foliculi.

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

jos) şi ajung la nivelul *inelului inguinal intern,* deasupra scrotului; în săptămâna 28 ele încep să coboare în scrot şi, la majoritatea fetuşilor, ajung în această poziţie la termen. La fetusul feminin nu se produce scurtarea gubernaculumului şi ovarele rămân în poziţie pelvină.

1.2. Diferenţierea sexuală

Sexul gonadic induce dezvoltarea **sexului fenotipic** adică formarea ductelor genitale şi a organelor genitale externe de tip feminin sau masculin, prin modificări caracteristice ale ductelor Wolf şi Müller, respectiv ale sinusului urogenital. Formarea structurilor de tip masculin este dependentă de secreţia activă a hormonilor produşi de testiculele fetale, în timp ce formarea structurilor de tip feminin nu necesită prezenţa ovarelor.

a). Formarea căilor genitale interne

Indiferent de sexul genetic, fetusul prezintă două structuri canaliculare: *ductele mezonefrice (Wolffiene)* şi *ductele paramezonefrice* (Mülleriene) din care se vor dezvolta, în luna a treia, căile genitale interne (CGI).

- *Formarea CGI masculine* este un proces *activ* care se desfăşoară sub acţiunea hormonilor testiculului fetal: *testosteronul* (acţionând local) determină, în săptămânile 8-13, stabilizarea ductelor Wolffiene şi diferenţierea lor în epididim, vase deferente şi vezicule seminale; canalele Mülleriene regresează (în săptămânile 8-10), prin acţiunea locală a hormonului anti-müllerian (AMH), secretat de celulele Sertoli (singurul rest din canalele Mülleriene este utricula prostatică).
- *Formarea CGI feminine* are loc în săptămânile 9-13, în mod *spontan*, în absenţa secreţiilor endocrine ale ovarelor (care nici nu sunt încă formate): ductele Wolffiene regresează, iar ductele Mülleriene se dezvoltă în trompe, uter şi treimea superioară a vaginului.

b). Formarea organelor genitale externe

Formarea organelor genitale externe (OGE) se realizează, în lunile a patra şi a cincea, pe seama *sinusului uro-genital* – o structură ambivalentă, bipotenţială, prezentă la ambele sexe şi alcătuită dintr-o protuberanţă mediană numită *tuberculul genital*, două pliuri mediale sau *pliurile uretrale* (sau urogenitale), ce flanchează *şanţul urogenital*; la exteriorul lor se formează două pliuri mai mari, numite *pliurile (bureletele) labioscrotale.*

- *Formarea OGE masculine.* Sub influenţa androgenilor, în special a *dihidrotestosteronului (DHT),* tuberculul genital se alungeşte şi formează *penisul*[20], pliurile uretrale *fuzionează*, dinapoi spre înainte, formând *uretra peniană*, iar pliurile labioscrotale cresc şi se unesc, formând *scrotul.*
- *Formarea OGE feminine.* În absenţa androgenilor, la fetusul feminin normal, tuberculul genital creşte puţin, formând *clitorisul.* Sinusul urogenital (SUG) rămâne deschis şi formează *septul vezicovaginal* între porţiunea genitală şi urinară a SUG, astfel că uretra se deschide anterior, iar vaginul posterior; vestibulul SUG este mărginit lateral de pliurile urogenitale, care nu fuzionează şi formează *labiile mici.* Lateral, pliurile labioscrotale se dezvoltă, formând *labiile mari* (unite posterior şi anterior).

c). Formarea identităţii şi comportamentului sexual

După naştere, pe baza configuraţiei OGE, se declară sexul civil şi apoi copilul este crescut ca fată sau băiat, într-un mediu sociocultural adecvat. La vârsta de 2-3 ani se stabileşte *identitatea sexuală*, definită prin *conştientizarea apartenenţei la un anumit sex.* La pubertate, sub acţiunea hormonilor sexuali, se formează caracterele sexuale secundare (*sexul pubertar*) şi se edifică *comportamentul sexual* sau expresia publică/socială a identităţii sexuale. Aşa cum am subliniat la început, acest proces, numit şi sexualitate, este la om mai important decât sexualizarea morfo-funcţională.

2. Controlul genetic şi hormonal al sexualizării

2.1. Reglarea genetică a dezvoltării gonadelor

Se ştie de câteva decenii că sexualizarea masculină este determinată de cromozomul Y: în prezenţa cromozomului Y, indiferent de numărul cromozomilor X, se formează testicule; în absenţa cromozomului Y se formează ovare (care însă nu au o structură şi funcţie normală decât în prezenţa ambilor cromozomi X). Efectul *dominant* al cromozomului Y este determinat de prezenţa unei/unor gene situate într-o mică regiune de pe braţul scurt, numită TDF (de la *Testis Determining Factors*). Studiul molecular al unor cazuri de *inversiuni sexuale* (în care sexul fenotipic este discordant faţă de cel genetic: bărbaţi XX, unele femei XY ş.a.) a dus, în 1990, la identificarea genei *SRY* (de la *Sex-determining Region on the Y chromosome*)

20. Penisul creşte în lungime cu circa 0,7 mm/săptămână atingând la termen dimensiunea normală de 3,5 cm.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

prezentă la toate mamiferele şi capabilă să inducă formarea testiculelor (introducerea genei *SRY* la un embrion XX de şoarece determină apariţia de testicule şi diferenţierea masculină).

Gena *SRY* (pentru gonade) şi hormonii testiculelor fetale (pentru CGI şi OGE), nu sunt însă singurii „actori" ai procesului de dezvoltarea sexuală, un proces secvenţial, ordonat şi extrem de complex. Studiile din ultimii ani au început descifrarea mecanismelor genetice care sunt responsabile de etapele sexualizării şi au permis înţelegerea unor aspecte din patologia acestor procese. Cert este faptul că determinismul şi diferenţierea sexuală sunt reglate de un complex de gene, factori de transcripţie, hormoni şi receptori (tabelul 15.4).

a). Formarea gonadelor primordiale

Formarea gonadelor primordiale reprezintă prima etapă în dezvoltarea gonadelor. Aşa cum am arătat, acest proces începe cu *formarea primordiilor gonadale nediferenţiate, bipotenţiale* din mezodermul intermediar şi *migrarea celulelor germinale primordiale,* care populează cordoanele sexuale primare din gonada nediferenţiată.

- Studiul mutaţiilor în diferite stări intersexuale au identificat câteva gene care sunt esenţiale pentru dezvoltarea *primordiilor gonadale*. Printre acestea se numără genele *NR5A1*, *WT1*, *LHX9* şi *EMX2* (tabelul 15.4); aceste gene, care codifică factori de transcripţie generali, *nu sunt specific sexuali* şi intervin şi în alte procese embrionare; dar *o combinaţie specifică* de acţiuni este probabil critică pentru formarea gonadelor primordiale. Mutaţiile acestor gene pot avea drept consecinţă absenţa dezvoltării gonadelor, alături de alte anomalii (absenţa suprarenalelor în cazul genei *NR5A1* sau absenţa rinichilor în cazul mutaţiilor genei *WT1*).

Tabelul 15.4. Principalele gene implicate în dezvoltarea gonadelor masculine şi feminine

Gena	*Localizare cromozomială*	*Proteina codificată*	*Funcţia proteinei*	*Fenotipul asociat mutaţiei*
WNT4	1p32-36	Glicoproteină secretată	Represia diferenţierii celulelor Leydig în gonadele feminine; Stimulează activitatea DAX1	Duplicaţie: disgenezie gonadică XY
RSPO1	1p34.3	Proteină nucleară	Acţiune sinergică cu a WNT4 în gonadele XX	Hermafroditism adevărat XX şi hiperkeratoză palmoplatară
LHX9	1q31-32	Proteină homeobox	Dezvoltarea precoce a gonadelor şi creierului anterior	Agenezia gonadelor masculine
FOXL2	3q23	Factor de transcripţie	Represia SOX9 şi a formării testiculelor la indivizi XX	Insuficienţă ovariană primară
DMRT1	9p24.3	Proteină DM	Menţinerea tubilor seminiferi după naştere	Disgenezie gonadică XY
NR5A1	9q33	Receptor nuclear	Dezvoltarea gonadelor primitive; reglarea sintezei de hormoni steroidieni	Mutaţiile heterozigote: disgenezie gonadică, insuficienţă suprarenaliană
EMX2	10q26.1	Proteină homeobox	Dezvoltarea precoce a gonadelor şi a neocortexului	Schizencefalia tip II
WT1	11p13	Proteină cu degete de zinc	Dezvoltarea gonadelor primitive şi a rinichilor; reglarea expresiei *SRY*	Pseudohermafroditism masculin şi disgenezie gonadică XY
DHH	12q13.1	Proteină cu rol în semnalizare	Reglator al celulelor Sertoli	Disgenezie gonadică XY şi neuropatie minifasciculară
FGF9	13q11-12	Factor de creştere	Proliferarea în gonada masculină şi dezvoltarea plămânilor	Inversiune sexuală
SOX9	17q24	Proteină HMG	Iniţiază dezvoltarea testiculară; diferenţierea celulelor Sertoli	Displazie campomelică cu disgenezie gonadică
CBX2	17q25	Proteină cromobox	Dezvoltarea testiculară	Disgenezie gonadică XY
AMH	19p13.3-p13.2	Hormon glicoproteic	Regresia canalelor Müller	Persistenţa ductului Müller cu criptorhidism bilateral
DAX1	Xp21.3	Receptor nuclear	Antagonizează efectele SRY	Duplicaţie: disgenezie gonadică XY; hipoplazie suprarenaliană congenitală
SRY	Yp11	Proteină HMG	Iniţiază dezvoltarea testiculară	Disgenezie gonadică XY (inversiune sexuală)

BUCUREŞTI UNIVERSITY LIBRARY

- *Gena NR5A1* codifică *factorul de transcripţie steroidogenic 1* (SF1), un receptor nuclear (cu ligand necunoscut) care se fixează la ADN (pe secvenţa AGGTCA) şi activează genele implicate în steroidogeneză. SF1 intervine însă şi în dezvoltarea embrionară a regiunilor cu funcţie endocrină: gonade primordiale la ambele sexe, suprarenale, hipofiză şi nucleii hipotalamici implicaţi în producerea de gonadotropine. SF1 reglează probabil şi alte gene ce acţionează în etapele următoare ale dezvoltării gonadale: *AMH*, *WT1* şi *DAX1*.
- *Gena WT1* – codifică (prin matisare alternativă) mai multe proteine cu funcţii diferite, ce funcţionează ca factori de transcripţie şi activează alte gene implicate în formarea rinichilor şi gonadelor primordiale; mutaţiile genei *WT1* determină sindromul Denys-Drash şi sindromul Frasier, afecţiuni în care pacienţii XY nu au gonade, iar OGE sunt ambigue sau feminine.
- *LHX9* şi *EMX2* – codifică proteine homeobox implicate în dezvoltarea gonadelor primordiale, dar şi a altor structuri embrionare.

- *Migrarea celulelelor germinale şi colonizarea gonadei primordiale* este controlată de genele *KIT* şi *KITLG* ce codifică un receptor nuclear (c-KIT) şi, respectiv, factorul Steel, ligandul pentru acest receptor, alături de integrina B1, caderina E şi IFITM1/3 (proteine transmembranare induse de interferon).

După formarea gonadei primordiale, sexualizarea evoluează diferit la cele două sexe.

b). Formarea testiculelor

La embrionul XY, diferenţierea gonadelor primordiale în testicule este iniţiată de expresia genei *SRY* (localizată pe cromozomul Yp11.3) la nivelul liniei precursorilor celulelor de susţinere care, sub acţiunea *SRY*, se *diferenţiază în celule Sertoli* (în absenţa SRY această linie formează celule foliculare); acesta este primul eveniment al diferenţierii testiculare.

Expresia genei *SRY* este declanşată[21] la circa 7 săptămâni de gestaţie şi este tranzitorie. Deci, *SRY* nu este implicată în *menţinerea* diferenţierii celulelor Sertoli, acest proces fiind realizat de alte gene, activate de SRY. Gena *SRY* este alcătuită dintr-un singur exon, care codifică o proteină (204 aminoacizi) cu rol de factor de transcripţie – printr-un domeniu HMG (*high motility group*) de legare la ADN, puternic conservat la toate mamiferele.

Gena *SRY* este o *genă master* care reglează transcripţia altor gene (precum *SOX9*) ce acţionează *în aval* de SRY. Alături de gena *SRY* sunt implicate şi o serie de gene autozomale (tabelul 15.4 şi figura 15.15). Printre acestea, gena *SOX9* pare a avea un rol major, fiind considerată efectorul principal ce acţionează în aval de SRY.

Gena *SOX9*, localizată pe cromozomul 17, codifică o proteină înrudită cu SRY, având un domeniu HMG de legare la ADN, puternic conservat. Mutaţiile acestei gene sunt implicate în producerea displaziei campomelice, o boală care asociază anomalii scheletice cu inversiune sexuală (femei XY).

Gena *SOX9* dirijează procesul de *organizare cordoanelor testiculare,* din care se vor forma tubii seminiferi, de către celulele Sertoli; în acest proces de interacţiuni celulă-celulă intervin probabil şi molecule de semnalizare celulară din familia WNT. Gena *SOX9* activează gena *AMH* (un membru al familiei TGFβ) în celulele Sertoli. Această genă codifică *hormonul*

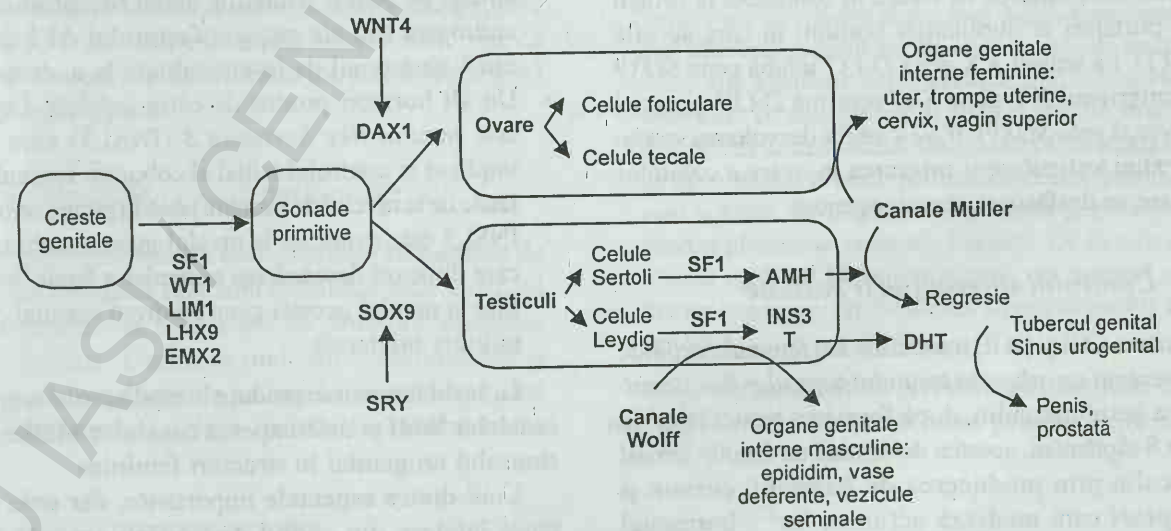


Figura 15.15. Principalele evenimente ale controlului molecular al dezvoltării sexuale la om

21. Activarea genei *SRY* ar putea fi produsă sau potenţată de către gena *WT1* deoarece în regiunea promotor a *SRY* a fost descris un situs de fixare a unui factor de transcripţie produs de *WT1*.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

anti-Müllerian (AMH) care determină regresia ductelor Müller şi, probabil, controlează transformarea celulelor interstiţiale nediferenţiate în celule Leydig, precum şi coborârea testiculelor. Efectul proteinei SOX9 este potenţat de proteinele SF1, WT1 şi GATA4 care se fixează pe promotorul genei *AMH*.

O etapă importantă în formarea testiculelor este *diferenţierea celulelor germinale primordiale în spermatogonii*. CGP sunt programate să se multiplice prin mitoză, să intre apoi în meioză şi să se oprească în profază (aşa cum se întâmplă în ovare); celulele Sertoli exprimă CYP26B1 care le opreşte în mitoză şi determină astfel evoluţia lor spermatogenică.

Un ultim proces din formarea testiculelor este *diferenţierea celulelor Leydig* din celulele mezenchimale din jurul cordoanelor; acest proces este controlat de mai multe gene, printre care *AMH*, *NR5A1* şi *ARX*.

Alte gene implicate în dezvoltarea testiculelor, ale căror mutaţii produc inversiune sexuală, sunt *DMRT1*, *FGF9*, *DHH* şi *CBX2*. De exemplu, *DMRT1* este exprimată, ca şi *SOX9*, la începutul dezvoltării testiculare, iar deleţia sa produce regresia testiculelor în stadii tardive ale dezvoltării embrionare, asociată cu androgenizare normală. Mutaţiile genei *DHH* produc absenţa spermatogenezei şi afectarea diferenţierii celulelor mioide peritubulare.

c. Formarea ovarelor

Reglarea genetică a formării ovarelor este mai puţin cunoscută. Se cunosc doar câteva gene cu rol major în acest proces precum genele *RSPO1*, *DAX1*, *WNT4* şi *FOXL2*. Dezvoltarea normală a ovarelor necesită funcţionarea ambelor alele ale genei *DAX1* (dovezi: disgenezia ovariană la fetuşii cu 45,X sau sindrom Turner ori formarea de ovare în bandeletă la fetuşii XY purtători ai duplicaţiei regiunii în care se află *DAX1*). La fetusul XX gena *DAX1* inhibă gena *SOX9* (la embrionul XY gena *SRY* reprimă *DAX1* şi astfel activează gena *SOX9*). *WNT4* inhibă dezvoltarea vascularizaţiei testiculare şi migrarea în ovare a celulelor în care se desfăşoară steroidogeneza.

2.2. Controlul diferenţierii sexuale

Formarea CGI şi OGE masculine sau feminine depinde de *prezenţa sau absenţa ţesutului testicular funcţional*.

La sexul masculin, după formarea testiculelor, la circa 8 săptămâni, acestea determină un fenotip sexual masculin prin producerea de *hormoni*, *enzime* şi *receptori* care mediază acţiunea lor[22]: hormonul luteinizant fetal (LH), receptorul LH şi HCG, enzimele implicate în biosinteza testosteronului, hormonul anti-müllerian (AMH) şi receptorul pentru AMH, steroid 5a-reductaza 2 (implicată în conversia testosteronului în dihidrotestosteron) şi receptorul de androgen.

- Diferenţierea ductelor Wolffiene în CGI masculine necesită *testotseron*, secretat de celulele Leydig, după activarea receptorului LH/CG de pe suprafaţa lor de către HCG în trimestrul I de sarcină şi apoi de către LH fetal; acţiunea testosteronului este mediată de *receptorul nuclear de androgeni* (AR), un factor de transcripţie care, după fixarea hormonului, interacţionează cu promotorul unor gene ţintă incomplet cunoscute (una din ele este gena pentru receptorul AMH, altele pot fi *HOXA10* şi *HOXA13*).
- Regresia ductelor Mülleriene este indusă de *hormonul anti-müllerian* (AMH)[23], un hormon glicoproteic (din clasa TGF-β) secretat de celulele Sertoli. Secreţia de AMH este indusă de produşii genelor *SOX9*, *NR5A1* şi *GATA4*. Acţiunea AMH necesită un *receptor specific*, AMHR (o proteină transmembranară cu activitate serin-treonin kinazică, a cărei sinteză este reglată în parte de gena *AR*); receptorul este situat în mezenchimul ce înconjoară canalele Mülleriene; interacţiunea AMH-AMHR induce involuţia lor prin apoptoză. Mutaţiile genelor *AMF* sau *AMHR* au ca rezultat sindromul persistenţei canalelor Müller.
- Masculinizarea OGE nediferenţiate (sinusul urogenital) se face prin acţiunea *dihidrotestosteronului* (DHT), produs prin conversia testosteronului de către 5a-reductaza 2; el are o mare afinitate pentru *receptorii de androgeni* (AR), codificaţi de o genă situată pe Xq11. Mutaţiile genei receptorului de androgeni sau ale genei cofactorului AF1 determină sindromul de insensibilitate la androgeni.
- Un alt hormon produs de către celulele Leydig este *insulin-like hormone 3* (INSL3) care este implicat în controlul iniţial al coborârii testiculelor fetale de la nivelul de formare până în punga scrotală. INSL3 este exprimat la nivelul gubernaculumului care dirijează descendenţa testiculelor fetale. Mutaţiile la nivelul acestei gene au drept rezultat criptorhidia bilaterală.

La sexul feminin se produce în mod normal regresia canalelor Wolf şi diferenţierea canalelor Müller şi a sinusului urogenital în structuri feminine.

Unul dintre aspectele importante, dar cele mai puţin înţelese din cadrul dezvoltării sexuale este

22. Trebuie precizat că influenţa testiculelor fetali asupra dezvoltării căilor genitale este exercitată exclusiv unilateral; dacă unul din testicule nu se dezvoltă sau este îndepărtat precoce în cursul vieţii fetale (experimente la animale), are loc dezvoltarea normală a oviductului ipsilateral, asociată cu involuţia controlaterală a ductului Muller.
23. AMH a mai fost denumit şi MIF, de la *Mullerian inhibiting factor*.

determinismul comportamentului sexual specific fiecărui sex. O serie de date experimentale cât şi unele observaţii derivate din studiul unor stări patologice la om susţin însă rolul major al hormonilor sexosteroizi în dezvoltarea comportamentului sexual. Hormonii sexuali par să acţioneze în cursul vieţii fetale şi în cursul perioadei neonatale asupra unor structuri specifice de la nivelul sistemului nervos central (hipotalamusul anterior şi sistemul limbic) determinând o organizare neuronală caracteristică fiecărui sex, care reprezintă astfel „substratul anatomic" al comportamentului sexual. Interesant este faptul că hormonul principal responsabil de organizarea de tip masculin a creierului la bărbaţi este *estradiolul*, produs prin conversia locală a testosteronului, sub acţiunea *aromatazei*[24]. La fetuşii de tip feminin există desigur estradiol circulant, dar acesta este legat de alfa-fetoproteină, o componentă majoră a serului fetal. Această proteină nu poate însă lega testosteronul, care va atinge astfel ţintele cerebrale. Alterarea acestei organizări specifice a creierului în cursul vieţii fetale şi în perioada neonatală este considerată a fi implicată în etiologia homosexualităţii.

3. Tulburări ale dezvoltării sexuale

Fiecare etapă din cadrul determinismului şi diferenţierii sexuale poate fi perturbată, producând tulburări variate de sexualizare[25] (tabelul 15.5). Cauzele unor asemenea afecţiuni sunt multiple, de la factori de mediu, precum administrarea unor medicamente cu efect virilizant în cursul sarcinii, la anomalii cromozomiale, mutaţii monogenice sau cauze multifactoriale precum în majoritatea cazurilor de hipospadias. Există dificultăţi reale de clasificare a acestor boli[26] şi, ca urmare, categoriile descrise mai jos prezintă adeseori suprapuneri parţiale.

3.1. Anomaliile cromozomilor sexuali

Acest grup frecvent de boli cuprinde tulburările de dezvoltare sexuală care sunt rezultatul unor anomalii cromozomiale de număr sau de structură, omogene sau în mozaic. Deoarece sindroamele Klinefelter şi Turner au fost discutate pe larg în capitolul 11, aici vor fi prezentate celelalte entităţi din tabelul 15.5.

Tabelul 15.5. Clasificarea tulburărilor de dezvoltare sexuală

Anomalii ale cromozomilor sexuali
• Sindromul Klinefelter
• Bărbaţii XX
• Sindromul Turner
• Disgenezia gonadică mixtă
• Hermafroditismul adevărat (46,XY/46,XX)
Anomalii ale formării sexului gonadic
• Disgenezia gonadică pură
• Disgenezia testiculară
• Sindromul testiculelor absente
Anomalii ale diferenţierii sexuale
• **Pseudohermafroditismul feminin**
– Hiperplazia congenitală suprarenaliană
– Excesul de androgeni de cauză nonadrenaliană (pseudohermafroditismul feminin nonadrenalian)
– Anomalii ale dezvoltării ductelor mülleriene
• **Pseudohermafroditismul masculin**
– Anomalii ale sintezei androgenilor
– Anomalii în acţiunea androgenilor
– Sindromul de persistenţă a ductelor mülleriene
– Defecte în dezvoltarea organelor genitale masculine

a). Sindromul bărbaţilor XX

Sindromul bărbaţilor XX este o afecţiune întâlnită la circa 1 din 20.000 nou-născuţi cu fenotip masculin. Trăsăturile clinice seamănă cu cele ale unui sindrom Klinefelter.

Testiculele sunt mici şi ferme (sub 2 cm), ginecomastia este frecventă, penisul are dimensiuni normale sau scăzute; alte elemente caracteristice sunt hialinizarea testiculară cu azoospermie şi absenţa oricăror structuri urogenitale de tip feminin. Identitatea psihosocială este de tip masculin, nivelele plasmatice ale testosteronului sunt scăzute, iar nivelele estradiolului şi gonadotropinelor plasmatice crescute. Bărbaţii XX au talia sub nivelul mediu al bărbaţilor normali, nu prezintă probleme cognitive, iar incidenţa hipospadiasului este crescută.

Majoritatea bărbaţilor XX au translocaţii ale unui mic segment din Yp (ce conţine gena *SRY*) pe Xp.

24. Şoarecii XY cu deficit de aromatază sau receptori de estrogeni nu au comportamentul masculin specific.
25. Clasificările tulburărilor de sexualizare folosite de diferiţi autori prezintă unele mici diferenţe; noi am optat pentru o clasificare recentă şi simplă.
26. În „Williams Textbook of Endocrinology" (2008) tulburările dezvoltării sexuale sunt împărţite în trei categorii: anomalii cromozomiale, tulburări de dezvoltare sexuală 46,XY (tulburări de dezvoltare testiculară; anomalii în sinteza sau recepţia androgenilor şi altele) şi tulburări de dezvoltare sexuală 46,XX (tulburări de dezvoltare ovariană, exces de androgeni şi altele). Din raţiuni practice preferăm clasificarea din tabelul 15.5. Entităţile descrise sunt prezente în ambele clasificări.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

b). Disgenezia gonadică mixtă

Disgenezia gonadică mixtă este determinată cel mai adesea de mozaicisme 45,X/46XY care apar prin pierderea cromozomului Y în una din primele diviziuni postzigotice. Indivizii afectați au de regulă un testicul pe o parte și un ovar fibrozat de cealaltă parte, dar pot exista și testicule disgenetice, sau ovare fibrozate bilateral. Incidența afecțiunii nu este cunoscută, dar este considerată a doua cauză de ambiguitate a organelor genitale externe la nou-născuți după hiperplazia congenitală suprarenaliană.

Fenotipul depinde de proporția și distribuția în organism a celulelor XY. La două treimi din cazuri domină fenotipul feminin, dar cu hipertrofie clitoridiană, sinus urogenital și fuziune parțială labioscrotală. În unele forme fenotipul poate fi asemănător cu cel al sindromului Turner. Testiculul este localizat cel mai adesea intra-abdominal, situație în care odată cu trecerea timpului crește riscul de malignizare, dar poate fi prezent și intrainghinal. Aproape invariabil sunt prezente uterul, vaginul și cel puțin o trompă uterină. Postpubertar testiculul, care conține numerose celule Leydig și tubi seminiferi numai cu celule Sertoli, va secreta androgeni, determinând fenomene de virilizare.

c). Hermafroditismul adevărat

Hermafroditismul adevărat[27] este o condiție în care sunt prezente ambele tipuri de gonade la același individ. Afecțiunea are o incidență necunoscută, până în prezent fiind descrise circa 400 de cazuri. Există mai multe variante: forme laterale (testicul pe o parte și ovar de cealaltă parte – 40%), forme unilaterale (un ovotestis pe o parte și testicul sau ovar controlateral – 40%) și forme bilaterale (ovotestis de fiecare parte – 20%). OGE sunt de obicei sub formă de peno-clitoris (hipospad) și labio-scrot.

Circa două treimi din cazuri prezintă cariotip 46,XX, 10% au cariotip 46,XY, iar restul sunt himere (XX/XY produse printr-o dublă fecundare) sau mozaicuri cu cel puțin o linie celulară cu un cromozom Y prezent. Mecanismul dezvoltării anormale a gonadelor nu este cunoscut. Doar 10% din cazurile 46,XX prezintă gena *SRY* ca urmare a translocației unei porțiuni a cromozomului Y. Restul sunt considerate a fi rezultatul unor mutații cu câștig de funcție ale unor gene situate în aval fața de *SRY* în calea de dezvoltare testiculară.

3.2. Anomalii ale formării sexului gonadic

Aceste afecțiuni sunt caracterizate prin prezența unui cariotip normal, dar cu anomalii în structura gonadelor.

a). Disgenezia gonadică pură

Aceasta cuprinde un grup de afecțiuni în care persoanele bolnave au un cariotip normal XX sau XY, sunt fenotipic femei și prezintă gonade cu structură anormală, adesea sub forma unor bandelete fibrozate. Se asociază frecvent o dezvoltare redusă a uterului și a trompelor uterine precum și a caracterelor sexuale secundare.

Disgeneziile gonadice pure sunt determinate de mutații la nivelul unor gene esențiale pentru dezvoltarea gonadelor. Există chiar forme familiale care sugerează o transmitere autozomal recesivă sau legată de X. În formele cu cariotip 46,XY pot exista mutații punctiforme sau deleții la nivelul genei *SRY* sau a altor gene care influențează expresia *SRY*.

b). Disgenezia testiculară

Disgenezia testiculară cuprinde un grup de tulburări ale dezvoltării testiculare care sunt prezente la indivizi cu cariotip 46,XY. Anomaliile testiculare pot merge de la unele foarte severe, asemănătoare cu cele din disgenziile gonadice pure, care conduc la inversiune sexuală, până la unele mai puțin severe. Deoarece genele implicate în producerea acestor boli (*WT1*, *SF1*, *SOX9*, *DAX1*, *WNT4*, *DHH*) controlează și dezvoltarea altor țesuturi, acestor anomalii li se asociază frecvent și alte afectări sistemice.

c). Sindromul testiculelor absente (agenezia gonadică)

Sindromul testiculelor absente cuprinde un spectru larg de manifestări fenotipice prezente la indivizi 46,XY cu testicule rudimentare sau absente, dar cu dovadă neechivocă că funcția testiculară endocrină (precum regresia ductelor Müller sau sinteza de testosteron) a existat cândva în cursul vieții embrionare. În contrast, în disgenezia gonadică pură XY nu există nici o dovadă a activității testiculare endocrine în cursul vieții embrionare. Cauzele regresiei funcției testiculare pot fi diverse, precum mutații ale unor gene, factori teratogeni sau traumatisme.

În forma pură de agenezie testiculară indivizi 46,XY sunt fenotipic femei, dar nu prezintă deloc structuri derivate din ductele Müller, și nici organe accesorii ale aparatului reproductiv de tip masculin. În aceste cazuri eșecul testicular a apărut după dezvoltarea celulelor Sertoli capabile să secrete hormon antimüllerian, dar înainte de debutul funcției celulelor Leydig. La extrema cealaltă sunt indivizi fenotipic bărbați, dar cu anorhie bilaterală (cu organe genitale externe masculine, dar adeseori micropenis, absența structurilor mülleriene și prezența celor wolffiene).

3.3. Anomalii ale diferențierii sexuale

Acest grup de boli cuprinde pseudohermafroditismele (PH) feminine și masculine, afecțiuni în care există

27. Denumirea de hermafroditism provine de la îmbinarea numelor zeului Hermes și a zeiței Afrodita.

BCU IAȘI - CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

o discordanță între sexul genetic și gonadic, normale și concordante, și OGE ambigue. În funcție de sexul genetic se deosebesc două forme: PH feminine (XX, ovare și diferite grade de masculinizare a OGE) – 85% din stările intersexuale și PH masculine (XY, testicule și OGE incomplet masculinizate) – 14% dintre stările intersexuale.

3.3.1. Pseudohermafroditismele feminine

Pseudohermafroditismele feminine apar la femei 46,XX cu ovare bilaterale, dar cu grade variabile de virilizare a tractului genital, datorită excesului de androgeni în cursul vieții fetale.

a). Hiperplazia congenitală suprarenaliană (HCS)

Hiperplazia congenitală de suprarenale (HCS) cuprinde un grup de afecțiuni ereditare, cu transmitere autozomal recesivă, produse de mutații ale genelor ce codifică enzime implicate în sinteza hormonilor steroidieni în corticosuprarenale (figura 15.16). În aceste boli se produce un deficit al sintezei de cortizol și, consecutiv acestuia, niveluri ridicate de ACTH care vor stimula continuu suprarenalele determinând HCS și frecvent hiperproducție de sexosteroizi care vor produce virilizarea unui făt 46,XX.

Cea mai frecventă formă de HCS este produsă de **deficitul de 21 hidroxilază** (circa 95% din cazuri) (vezi caseta 15.9), dar pot fi implicate deficitul de 11-beta-hidroxilază (~5% din cazuri) și, foarte rar, deficitele de 17-alfa-hidroxilază, 3-beta-hidroxisteroid dehidrogenază izomerază sau 20,22-desmolază (tabelul 15.6).

b). Pseudohermafroditismul feminin nonadrenalian

Aceste boli pot fi determinate de mutații la nivelul genei care codifică *aromataza placentară* (*CYP19*), care cauzează virilizarea embrionilor feminini datorită conversiei deficitare a androgenilor în estrogeni. Pseudohermafroditismul feminin poate apărea, de asemenea, ca urmare a unor *tumori ovariene virilizante* (precum areoblastoamele sau luteoamele) sau mai rar ca urmare a unor *tumori virilizante suprarenaliene*. De asemenea, administrarea unor *compuși progesteronici* cu efecte secundare androgenice (precum 17-alfa etinil-19-nortestosteronul) pentru prevenirea avorturilor poate determina masculinizarea fetușilor feminini.

c). Anomaliile dezvoltării ductelor mülleriene (sindromul Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser)

Acest sindrom reprezintă a doua cauză de amenoree ca frecvență după sindromul Turner. Pacientele prezintă aplazia celor 2/3 superioare ale vaginului și a uterului și majoritatea pacientelor sunt identificate ca urmare a absenței menstruațiilor la vârsta pubertară. Înălțimea este normală, ca și caracterele sexuale secundare. Boala se poate asocia cu anomalii renale (agenezie, ectopie, rinichi în potcoavă) sau scheletice (vertebre supranumerare, asimetrice sau fuzionate – sindromul Klippel-Feil).

3.3.2. Pseudohermafroditismele masculine

Pseudohermafroditismele masculine (defecte în virilizarea embrionilor 46,XY) pot apărea ca urmare a unor

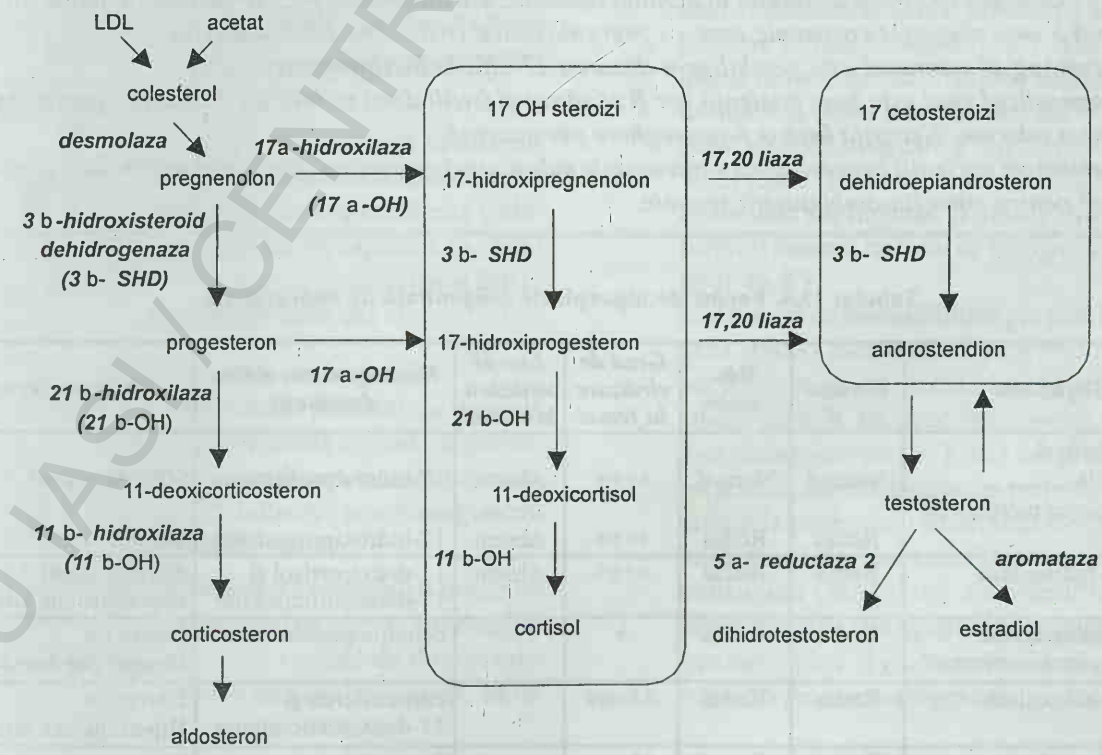


Figura 15.16. Căile biosintezei hormonilor steroidieni

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 15.9 *OMIM + 201910*

Deficiența în 21-hidroxilază

Definiție: *deficiența în 21-hidroxilază produce la fătul feminin grade diferite de virilizare a organelor genitale externe; este cea mai frecventă formă de pseudohermafroditism feminin; se mai numește sindrom adreno-genital sau hiperplazie congenitală de suprarenală.*

Incidență: *1:8.000-1:25.000 nou-născuți.*

Manifestări clinice: *afecțiunea este evidentă la nou-născuții de sex feminin, care prezintă o ambiguitate a organelor genitale externe (hipertrofie clitoris); circa 1/3 din astfel de cazuri nu vor avea alte manifestări (aceasta este forma cu virilizare simplă). Ceilalți vor prezenta, în a doua săptămână de viață, vărsături, deshidratare/hipovolemie și stare de șoc, fatală fără tratament patogenic (forma severă cu pierdere de sare). A treia formă clinică de prezentare (HCS non-clasică) este virilizarea cu debut tardiv care apare în copilărie sau în adolescență. Boala se poate manifesta și la băieți; ei vor avea OGE normale, dar ar putea prezenta o precocitate sexuală.*

Patogenie: *21-hidroxilaza intervine în steroidogeneza suprarenaliană, în sinteza de aldosteron și cortizol (figura 15.16). Deficiența enzimei blochează formarea celor doi hormoni și determină o hiperproducție de androgeni; aceasta începe după luna a III-a de gestație și produce masculinizarea variabilă a OGE la fătul de sex feminin (cu XX și ovare). De aceea, boala mai este numită sindromul adreno-genital, fiind o formă de pseudohermafroditism feminin. Absența completă a aldosteronului produce „pierderea de sare". Absența cortizolului va determina o secreție crescută și continuă de ACTH care va duce la hiperplazia congenitală de corticosuprarenală.*

Genetică: *boala se transmite autozomal recesiv. Rezultă prin mutațiile genei CYP21B pentru citocromul P450 implicat în steroid-21-hidroxilare. Gena este situată pe 6p21-3 în regiunea HLA III, în vecinătatea genei HLA B, cu care se transmite strâns înlănțuită. Mutațiile prezintă o asociere alelică preferențială cu haplotipul HLA A11, B55, DR4. Heterozigoții, purtători sănătoși de genă anormală, pot fi identificați prin analiza ADN; interesant de semnalat este faptul că ei au un avantaj selectiv, fiind rezistenți la infecțiile cu Haemophilus influenzae tip B. Cele trei forme clinice sunt produse de mutații diferite, cu un nivel rezidual de activitate enzimatică diferit.*

Diagnostic: *OGE au grade diferite de virilizare, gonadele nu se palpează în labioscrot, OGI feminine, sex genetic feminin, niveluri crescute ale 17-cetosteroizilor urinari, 17-alfa-hidroxiprogesteronului și ACTH (care se normalizează sub tratament).*

Diagnostic prenatal: *este posibil fie prin analiza ADN în celulele vilozităților coriale, fie prin determinarea 17-alfa-hidroxiprogesteronului în lichidul amniotic. Un diagnostic pozitiv va duce la administrarea maternă a unui preparat cortizonic care va preveni/reduce virilizarea OGE a fătului.*

Screening-*ul neonatal* *este posibil prin dozarea 17-alfa-hidroxiprogesteronului.*

Prognosticul *vital este bun; pacienții vor fi sănătoși și fertili dacă se face un diagnostic precoce și un tratament adecvat. Necesită însă o supraveghere permanentă.*

Tratament: *pacienții primesc toată viața terapie substitutivă cu cortizol și mineralocorticoizi; chirurgie plastică pentru corecția ambiguității sexuale.*

Tabelul 15.6. Forme de hiperplazie congenitală de suprarenală

Deficiența	*Cortizol*	*Aldosteron*	*Grad de virilizare la femei*	*Eșecul virilizării la bărbați*	*Hormonul steroidian dominant*	*Alte caracteristici*
21-hidroxilază – parțială	Normal	Normal	++++	Absent	17-hidroxiprogesteron	90% din cazuri
– severă (cu pierdere de sare)	Redus	Redus	++++	Absent	17-hidroxiprogesteron	5% din cazuri
11-beta-hidroxilaza	Redus	Redus	++++	Absent	11-deoxicortisol și 11-deoxicorticosteron	5% din cazuri Hipertensiune arterială
3-beta-hidroxisteroid dehidrogenaza izomeraza 2	Redus	Redus	+	++++	dehidroepiandrosteron	Foarte rar Deseori pierdere de sare.
17-alfa-hidroxilaza	Redus	Redus	Absent	++++	corticosteron și 11-deoxicosticosteron	Foarte rar Hipertensiune arterială
20,22-desmolază	Redus	Redus	Absent	+++	Lipsa globală de sinteză prin deficit de colesterol	Foarte rar

defecte în sinteza androgenilor, defecte în acţiunea androgenilor, defecte în regresia ductelor mülleriene, sau ca urmare a unor cauze incerte.

a). Anomalii în sinteza hormonilor androgeni

Anomaliile sintezei hormonilor androgeni sunt responsabile doar de aproximativ o cincime din cazurile de pseudohermafroditism masculin. În această categorie se încadrează agenezia celulelor Leydig sau hipoplazia lor produsă printr-un defect al receptorilor hCG/LH precum şi deficite enzimatice ce afectează biosinteza androgenilor. Fiecare dintre aceste defecte blochează o etapă în conversia colesterolului către testosteron (vezi figura 15.16):

- mutaţia genei *DHCR7* (care codifică 7 dehidrocolesterol reductaza), în sindromul Smith- Lemli-Opitz, alterează transformarea acetatului în colesterol (65% din cazuri au anomalii OGE);
- mutaţia genei *STAR* (care codifică reglatorul steroidogenetic) afectează transportul colesterolului din citoplasmă către interiorul mitocondriei la nivelul glandelor suprarenale şi a gonadelor; produc hiperplazia lipoidă congenitală de suprarenală);
- deficienţa 3 beta hidroxisteroid dehidrogenazei izomeraza 2 alterează transformarea dehidroepi--androstendionului în androstendion;
- deficienţa de 17 alpha hidroxilază (CYP17) alterează hidroxilarea în poziţia 17 a pregnenolonului şi progesteronului;
- deficienţa 17,20 liazei alterează transformarea 17 OH steroizilor în 17 cetosteroizi;
- deficienţa 17 beta hidroxisteroid dehidrogenazei 3 – cea mai frecventă formă – afectează ultima etapă în sinteza testosteronului, reducerea grupării 17-ceto a androstendionului.

Toate aceste boli cu defecte în sinteza testosteronului sunt caracterizate prin regresia normală a ductelor Müller. Masculinizarea tractului urogenital este variabilă, de la aspect masculin cu hipospadias moderat până la aspect feminin, în funcţie de severitatea defectelor enzimatice şi existenţa unor căi alternative.

b). Anomalii în acţiunea androgenilor

Aceste boli se caracterizează prin sinteza normală a testosteronului şi regresia normală a canalelor Müller, prezenţa anomaliilor în dezvoltarea fenotipului masculin fiind determinată de tulburări în acţiunea androgenilor la nivelul ţesuturilor-ţintă.

- **Deficienţa 5 alfa reductazei 2** este o boală transmisă autozomal recesiv caracterizată prin: hipospadias sever perineoscrotal, sac vaginal de dimensiune variabilă deschis fie în sinusul urogenital, fie în uretră, testicule normal dezvoltate cu canalele ejaculatorii deschise în fundul de sac vaginal, pilozitate de tip feminin după pubertate, dar fără dezvoltarea sânilor, absenţa uterului şi a trompelor uterine şi nivel normal al testosteronului. Enzima 5 alfa reductaza 2 este responsabilă de conversia testosterolului în *dihidrotestosteron*, hormon care după cum am precizat controlează dezvoltarea organelor genitale externe şi a sinusului urogenital. În schimb, organele derivate din canalele Wolf, a căror dezvoltare este dependentă de testosteron, au aspect normal.
- **Anomalii ale receptorului androgenic**[28] (AIS). Receptorul androgenic face parte din familia receptorilor nucleari, fiind codificat de gena *AR* localizată pe cromozomul X (Xq11). Mutaţiile acestei gene alterează acţiunea hormonilor androgeni la nivelul organelor-ţintă perturbând, ca urmare, dezvoltarea fenotipică de tip masculin şi virilizarea. AIS se transmite recesiv legat de X fiind produs de mutaţii în gena *AR*.
  - **Sindromul de insensibilitate completă la androgeni** (CAIS sau sindromul Morris) este o formă frecventă de pseudohermafroditism masculin (1/20.000 nou-născuţi). Este a treia cauză de amenoree primară după sindromul Turner şi absenţa congenitală a vaginului. Diagnosticul este pus prepubertar datorită identificării unei hernii inghinale care conţine un testicul, sau postpubertar datorită amenoreei. Majoritatea cazurilor au aspect feminin normal cu caractere sexuale secundare normale, exceptând reducerea/absenţa pilozităţii axilare şi pubiene („*femeile manechin*"). Vaginul este închis în fund de sac şi adesea rudimentar, iar trompele şi uterul sunt absente, datorită hormonului antimüllerian care a fost secretat în cursul vieţii fetale. Testiculele pot fi localizate intraabdominal sau inghinal şi trebuie extirpate chirurgical datorită riscului de malignizare. Cariotipul 46,XY.
  - **Sindromul de insensibilitate parţială la androgeni** (PAIS) este întâlnit mult mai rar. OGE pot fi feminine, dar cu clitoromegalie şi fuziune labială parţială, ambigue (micropenis, hipospadias perineo-scrotal, ± TNC) sau predominant masculine, dar cu hipospadias perineal şi ginecomastie la pubertate (sindromul Reifenstein).
  - **Sindromul de insensibilitate moderată la androgeni** (MAIS sau sindromul bărbaţilor subvirilizaţi) cu fenotip şi OGE masculine, virilizare incompletă şi ginecomastie după pubertate, tulburări de spermatogeneză.

28. Sindromul de insensibilitate la androgeni (AIS) poate fi în formă completă (CAIS), parţială (PAIS) sau moderată (MAIS).

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

c). Sindromul persistenței ductelor Müller

Acest sindrom rar, fiind întâlnit la indivizi cu gonade și fenotip de tip masculin, dar care asociază în plus și prezența uterului și a trompelor uterine, adeseori vestigiale și situate în canalele inghinale. Afecțiunea, transmisă autozomal recesiv, este determinată de mutații fie la nivelul genei care codifică hormonul antimüllerian, fie al genei pentru receptorul acestuia, ceea ce afectează regresiunea structurilor derivate din canalele Müller.

d). Defecte în dezvoltarea organelor genitale masculine

Aceste boli sunt reprezentate de hipospadias și criptorhidie.

- **Hipospadiasul** este o anomalie congenitală frecventă (0,5-0,8% din băieți) în care deschiderea uretrei are loc într-o poziție anormală pe fața ventrală, într-un punct situat intermediar între sediul normal și perineu. În funcție de poziția orificiului uretral, hipospadiasul este clasificat în glandular, penian sau perineoscrotal. Adeseori se asociază contracția și incurbarea ventrală a penisului (cordee). Deoarece dezvoltarea penisului este dependentă de androgeni, hipospadiasul este considerat a fi rezultatul unor anomalii în formarea sau acțiunea acestora. Cu toate acestea, cauzele cunoscute (boli monogenice, boli cromozomiale, ingestia unor droguri, expunerea la pesticide sau alți agenți chimici din mediu în cursul sarcinii) sunt responsabile doar de o parte din cazuri, în restul etiologia fiind necunoscută. Asocierea frecventă cu greutatea mică la naștere sugerează o legătură între factorii care controlează dezvoltarea fetală precoce și cei care intervin în fuzionarea completă a uretrei (începutul trimestrului II de sarcină).
- **Testicului necoborât congenital** – TNC (criptorhidismul). Aproximativ 3% din nou-născuții la termen și 30% din nou-născuții de sex masculin prematuri prezintă cel puțin un testicul necoborât în scrot în momentul nașterii, dar coborârea este adeseori completată în următoarele luni, astfel că la vârsta de un an incidența TNC este de circa 0,6 – 0,7%. Deși au fost identificați câțiva factori care controlează descendența testiculară, cauzele criptorhidismului sunt încă puțin cunoscute. Cele două complicații majore ale criptorhidismului sunt afectarea spermatogenezei și transformarea malignă.

4. Conduita practică în tulburările de sexualizare

Depistarea unei ambiguități sexuale la naștere este o *urgență psihosocială*. Problema esențială pentru medic este un *diagnostic corect, cât mai precoce posibil*. Medicul neonatolog trebuie să recunoască orice *incertitudine* privind „sexul adevărat" al copilului, examinând minuțios OGE. Ținând cont de vârsta gestațională, el trebuie să fie atent la orice mici modificări în structura genitală, mai ales la hipertrofiile clitoridiene, micropenisul (<2,5 cm) sau testiculele mici, hipospadiașul cu sau fără TNC. În aceste situații, ca și în ambiguitățile sexuale mai pronunțate, neonatologul trebuie să facă un *examen local și general complet*, evaluând orificiile perineale, mărimea penisului/clitorisului, prezența sau absența gonadelor în poziția lor anatomică sau pe traiectul inguinal, prezența unor anomalii congenitale asociate. În funcție de aceste date, care se adaugă la *o anamneză corectă a sarcinii și istoricului familial*, el va recomanda părinților să nu stabilească imediat numele copilului; eliberarea certificatului de naștere poate fi întârziată până la stabilirea definitivă a sexului și, implicit, a numelui ce va fi dat copilului. Cel mai bine ar fi ca pacientul să fie îndrumat către o echipă completă (pediatru, endocrinopediatru, genetican, chirurg pediatru, psiholog) și antrenată în diagnosticul și managementul stărilor intersexuale.

Analiza cromozomială este primul pas important pentru stabilirea sexului genetic; în această acțiune se vor evalua un număr suficient de metafaze pentru a exclude un mozaic, se va analiza, prin marcaj G sau R și Q morfologia cromozomului Y și în unele cazuri se va recurge la FISH, pentru identificarea unor anomalii structurale ale cromozomilor sexuali. Copiii cu cariotip XX pot avea PHF – prin HCS sau forme nonadrenale – sau hermafroditism adevărat (HA) ori disgenezii gonadice; copiii cu cariotip XY – se încadrează adesea în grupul eterogen și complex al anomaliilor sintezei și acțiunii androgenilor (PHM).

În etapele următoare se vor întreprinde *studii imagistice* (US, CT, RMN) – pentru a decela sau nu structuri mülleriene, *explorări hormonale* (17-hidroxiprogesteronul și steroizii gonadali, în plasmă și urină) și *analize biochimice* (electroliții serici). Pe baza acestor date se va face un *diagnostic de etapă*, care, în principiu, permite o decizie fermă privind sexul în care va fi crescut copilul (rolul sexual).

Acesta este momentul unei discuții ample, simple și lucide (a întregii echipe) cu ambii părinți, pentru *a se stabili sexul în care va fi declarat și crescut copilul*. Este un moment dificil în care se va ține cont de anxietățile părinților, concepțiile lor religioase, morale și culturale, precum și de nivelul lor de înțelegere. Opțiunea finală va depinde în mare măsură de posibilitățile care există pentru *realizarea unor structuri genitale neambigue și funcționale sexual*. O mare importanță va fi dată (în cazul sexului masculin) mărimii penisului și glandului precum și potențialului lor

de a creşte (după testul cu testosteron parenteral). Celelalte elemente contează mai puţin deoarece chirurgia actuală permite o reconstrucţie corespunzătoare, tratamentul hormonal de substituţie – o sexualizare cvasinormală, iar „tratamentul" psihologic – o inserţie socială adecvată.

Decizia informată a părinţilor, înţelegerea şi cooperarea lor sunt decisive pentru stabilirea cu succes a sexului adecvat al pacientului.

Gama explorărilor se va continua cu *endoscopie şi urogenitografie* (în cazurile cu persistenţa SUG), iar uneori *laparotomie şi biopsie gonadică* (în anomalii ale sintezei şi acţiunii androgenilor, HA şi unele cazuri de exces de androgeni nonadrenal), *investigaţii hormonale complete*; scopul lor este un diagnostic etiologic cât mai bun cu putinţă.

Echipa de medici va asigura apoi *o îngrijire continuă corespunzătoare* prin care rolul sexual stabilit va fi amplificat de folosirea unor măsuri adecvate de reparare chirurgicală precoce, tratamente hormonale şi susţinere psihologică.

Tot acest scenariu este însă unul normal, perfect, într-o medicină performantă (prin calitatea medicilor şi dotări); din păcate se mai produc uneori erori de diagnostic şi stabilirea a sexului civil adecvat sau diagnostice tardive. Există de asemenea cazuri, în care postpubertar pacienţii solicită schimbarea sexului stabilit (mecanismele *determinismul comportamentului sexual* nu sunt elucidate) şi care trebuie consiliate de o echipă complexă şi experimentată. Acestea dovedesc că stabilirea sexului adecvat în cazurile cu ambiguitate sexuală este dificilă şi delicată şi necesită o monitorizare ulterioară atentă. Controversele privind vârsta optimă a intervenţiilor chirurgicale continuă: există păreri care militează pentru acţiuni precoce (sub 30 de luni) şi radicale, dar şi opinii numeroase privind o atitudine conservatoare şi intervenţii reduse. Doar în ceea ce priveşte gonadectomia în cazurile de formaţiuni testiculare intraabdominale (risc de malignizare) opiniile sunt ferme şi convergente.

Bibliografie specifică selectivă

1. Boorman CJ, Shimeld SM. *The evolution of left-right asymmetry in chordates*. Bioessays 2002; 24: 1004-1011.
2. Copp AJ, Greene ND. *Genetics and development of neural tube defects*. J Pathol 2010; 220: 217-230.
3. Dubrulle J, Pourquie O. *From head to tail: links between the segmentation clock and antero-posterior patterning of the embryo*. Curr Opin Genet Dev 2002; 12:519-523.
4. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB *et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Nature 2003; 423:293-298.
5. Freeman M, Gurdon JB. *Regulatory principles of developmental signaling*. Annu Rev Cell Dev Biol 2002; 18:515-539.
6. Hackett BP. *Formation and malformation of the vertebrate left-right axis*. Curr Mol Med 2002; 2:39-66.
7. Hamada H, Meno C, Watanabe D, Saijoh Y. *Establishment of vertebrate left-right asymetry*. Nat Rev Genet 2002; 3:103-113.
8. Hiort O, Holterhus PM. *The molecular basis of male sexual differentiation*. Eur J Endocrinol 2000; 142:101-110.
9. Kashimada K, Koopman P. *Sry: the master switch in mammalian sex determination*. Development 2010; 137:3921-3930.
10. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. *The essence of senescence*. Genes Dev 2010; 24:2463-2479.
11. Lecuit T, Pilot F. *Developmental control of cell morphogenesis: a focus on membrane growth*. Nat Cell Biol 2003; 5:103-108.
12. Meier P, Finch A, Evan G. *Apoptosis in development*. Nature 2000; 407:796-801.
13. Piprek RP. *Molecular and cellular machinery of gonadal differentiation in mammals*. Int J Dev Biol 2010; 54:779-786.
14. Rodda SJ, Kavanagh SJ, Rathjen J, Rathjen PD. *Embryonic stem cell differentiation and the analysis of mammalian development*. Int J Dev Biol 2002; 46:449-458.
15. Srivastava D. *Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis*. Cell 2006; 126:1037-1048.
16. Surani MA. *Germ cells: the eternal link between generations*. C R Biol 2007; 330:474-478.
17. Tickle C. *Molecular basis of vertebrate limb patterning*. Am J Med Genet 2002; 112:250-255.
18. Tilmann C, Capel B. *Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination*. Recent Progress Horm Res 2002; 57:1-18.
19. Troen BR. *The biology of the aging*. Mount Sinai J Med 2003; 70:3-22.
20. van Gelder MM, van Rooij IA, Miller RK, Zielhuis GA, de Jong-van den Berg LT, Roeleveld N. *Teratogenic mechanisms of medical drug*. Hum Reprod Update 2010; 16:378-394.
21. Visconti PE, Florman HM. *Mechanisms of sperm-egg interactions: between sugars and broken bonds*. Sci Signal 2010; 3:pe35.

22. Wedlich D. *The polarising role of cell adhesion molecules in early development.* Curr Opin Cell Biol 2002; 14:563-568.
23. Wheeler HE, Kim SK. *Genetics and genomics of human ageing.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2011; 366:43-50.
24. Yuan J, Kroemer G. *Alternative cell death mechanisms in development and beyond.* Genes Dev 2010; 24:2592-2602.
25. Zaffran S, Frasch M. *Early signals in cardiac development.* Circ Res 2002; 91:457-469.
26. Zeller R. *The temporal dynamics of vertebrate limb development, teratogenesis and evolution.* Curr Opin Genet Dev 2010; 20:384-390.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 16

RETARDUL MENTAL

Retardul mental (RM) reprezintă o problemă importantă a practicii medicale, fiind o afecțiune cronică, frecventă (2-3% din populație), cu efecte negative asupra societății, sănătății publice, bolnavului și familiei sale. De asemenea, RM are o pondere majoră în activitatea serviciilor de genetică medicală solicitate să stabilească în primul rând cauzele bolii pentru a determina corect riscul de recurență și, atunci când este posibil, posibilitățile de prevenție.

A. Date generale: definiție, clasificare, prevalență

Retardul mental reprezintă consecința funcționării suboptimale a sistemului nervos central care determină o limitare semnificativă a funcțiilor intelectuale și un deficit al comportamentului adaptativ exprimat prin capacități adaptative practice, sociale și conceptuale subnormale și cu debut înaintea vârstei de 18 ani.

În Europa se folosește definiția RM din cadrul clasificării internaționale a bolilor OMS (ICD 10), în timp ce în SUA se folosesc criteriile stabilite de *American Psychiatric Association* și *Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV-TR). Ambele sunt similare și includ trei criterii:

- *Reducerea semnificativă sub medie a funcției intelectuale* (IQ sub 70); nivelul de inteligență se poate determina prin performanța pacientului la *teste cognitive* standardizate (Wechsler, Stanford-Binet sau IQ); coeficientul de inteligență – IQ – este raportul dintre vârsta mentală și vârsta cronologică, înmulțit cu 100; IQ are în populație o distribuție normală (continuă) gaussiană, cu o medie populațională $\mu=100$ și o deviație standard $\delta=15$.
- *Limitarea semnificativă* a *funcției adaptative*, evaluată în raport cu comportamentul specific pentru o anumită vârstă și cu abilitatea de a răspunde la solicitările vieții zilnice:
  - *sugar/copil mic*: întârziere de dezvoltare;
  - *preșcolar*: incapacitate de autoîngrijire, de utilizare a limbajului și comunicare, comportament adecvat;
  - *școlar*: dificultăți de învățare (de gândire abstractă);
  - *adolescent/adult*: imposibilitatea independenței economice și a integrării satisfăcătoare familiale și sociale[1].
- *Deficitul cognitiv și adaptativ se produce înaintea vârstei de 18 ani.*

În ultimul timp, în marea majoritate a țărilor, se renunță la termenul de retard mental și se folosește cel de dizabilitate intelectuală/dizabilitate de învățare/afectare cognitivă/handicap mental/întârziere în dezvoltare (la vârste mai mici).

Deoarece diagnosticul RM necesită o evaluare precisă și validă a inteligenței, la copiii cu vârsta sub 5 ani (la care testarea IQ nu poate fi aplicată) se utilizează termenul de întârziere globală în dezvoltare. *Întârzierea în dezvoltare* este definită ca o întârziere semnificativă în două sau mai multe dintre următoarele

1. Limitarea trebuie să intereseze cel puțin două dintre următoarele arii de abilitate adaptativă: comunicare, autoîngrijire, sănătate și protecție/siguranță, orientare, școlarizare, deprinderi sociale/comunitare și relații interpersonale, viață independentă, muncă și activități în timpul liber, viață de familie. La bolnav, limitările coexistă cu elemente normale și chiar puternic dezvoltate; cunoașterea „profilului" fiecărui bolnav permite luarea unor măsuri adecvate, personalizate, de susținere care, aplicate pe o durată mare de timp, vor îmbunătăți viața unui individ cu retard mental.

BCU "IULIA HAȘDEU" UNIVERSITY LIBRARY

domenii: percepție, vorbire/limbaj, dezvoltare motorie fină/grosieră, aptitudini sociale/personale și activități zilnice. Anumite boli (paralizia cerebrală, unele boli neuromusculare) se pot manifesta prin întârziere în dezvoltare la copilul mic, deși copilul se poate încadra în limitele normale ale inteligenței atunci când vârsta va permite o evaluare precisă, deci întârzierea în dezvoltare nu este urmată întotdeauna de retard mental.

Clasificarea RM se poate face pe baza mai multor criterii. În opinia noastră, cunoașterea, definirea clară și folosirea lor adecvată sunt foarte importante.

După *severitate*, pe baza nivelului IQ se pot deosebi două forme majore de RM (tabelul 16.1):

- *RM ușor* (IQ=50-70) este produs cel mai frecvent de un mediu familial/cultural deficitar; afectează mai mult categoriile sociale defavorizate și, datorită mediului familial deficitar, riscul de recurență este relativ mare; cauzele biomedicale sunt rare (până la 20%) și cel mai frecvent multifactoriale; pacienții sunt educabili, pot fi absorbiți în activități simple și au un grad relativ de independență.
- *RM sever* (IQ<50) poate fi subdivizat în: moderat (IQ=35-50), sever (IQ=20-35) și profund (IQ<20); mai rar, este consecința mediului familial deficitar și are o distribuție identică la toate categoriile sociale; cauzele biomedicale sunt de două ori mai frecvente ca în RM ușor (până la 50%); necesită îngrijiri în instituții speciale; riscul de recurență este mai mic.

La copii se folosesc teste speciale (în funcție de vârstă) pentru evaluarea IQ: scala Bayley de dezvoltare a sugarului (BSID – pentru copii de până la 42 luni) și scala de inteligență Wechsler pentru copii (WISC – pentru copii între 6 și 16 ani).

În legătură cu clasificarea RM după severitate, trebuie subliniate două aspecte importante în practică: (1) pentru sfatul genetic este mai puțin importantă estimarea nivelului RM și mult mai utilă prezența unei *diferențe calitative* atunci când se compară inteligența pacientului cu cea a părinților sau a fraților lui; (2) aceeași cauză poate produce grade diferite de RM.

Există și o *clasificare educațională* a bolnavilor cu RM (tabelul 16.1) care deosebește trei categorii: *educabili* – pot învăța la școală lucruri simple, dar nu progresează dincolo de nivelul clasei a V-a; *antrenabili* – pot deprinde măsurile de îngrijire zilnică, dar foarte puțini vor învăța să citească și să scrie; *neantrenabili* – sunt total dependenți și necesită îngrijire pe termen lung, de obicei într-un cadru instituționalizat.

După *fenotip*, se pot deosebi două forme de RM:

- *RM nesindromic, nespecific sau izolat*, fără alte manifestări fizice (dismorfii, anomalii congenitale) sau neurologice, neuroimagistice;
- *RM specific sau sindromic* asociat cu alte manifestări fenotipice.

După *cauze*, RM poate fi împărțit în trei categorii:

- *RM produs de mediu*: cauze infecțioase, agenți chimici (alcoolismul), factori nutriționali, imunologici etc.;
- *RM de cauze genetice sau epigenetice*: boli monogenice (de exemplu, RM legat de X – RMLX, dar și alte forme), cromozomiale (10% RM ușor și 30% RM sever) sau mutații monogenice ale genelor implicate în mecanismul epigenetic;
- *RM idiopatic*: forme cu determinism posibil multifactorial.

Prevalența RM a fost estimată, în Europa și SUA, de către OMS (2001) a fi în jur de 1-3% din populația generală. Studiile efectuate între 1997-2002 raportează o prevalență a RM sever relativ constantă (în medie 3-4‰, cu limite între 1-7‰) și o prevalență a RM ușor cu o variabilitate mare (2-85‰, în medie 33‰). Ratele foarte diferite ale RM raportate în literatură pot

Tabelul 16.1. Clasificarea și prevalența retardului mental (RM)

Terminologie RM (OMS)		Prevalență per 1.000	Nivelul IQ (OMS, 1980)	DSM IV, 1994		Nivel educațional	Intensitatea susținerii necesare
				Nivelul IQ	Pondere		
Intelect liminar			70-85	70-85			
Ușor		20-30	50-70	50-(55)-70	85%	Educabil	Intermitentă
Sever	moderat	3-4	35-50	35-(40)-50-(55)	10%	Antrenabil	Limitată
	sever		20-35	20-(25)-35-(40)	3-4%	Neantrenabil	Extinsă
	profund		<20	<20-25	1-2%	Neantrenabil	Permanentă

Surse: OMS, 2001; Schaefer și Bodensteiner, 1992; Stevenson, 1996; Roeleveld *et al.*, 1997; Knight, 2010. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. ed. a-IV-a (DSM IV). 1994.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fi atribuite diferențelor de definire, clasificare și metode de diagnostic al persoanelor cu RM, și mai puțin unor diferențe reale de prevalență.

Este interesant de subliniat faptul că în ambele forme de RM există un exces de bărbați afectați: de 40-80% (cu *sex ratio* – bărbați:femei – de 1,4-1,8%) pentru RM ușor și de 20% (cu *sex ratio* – bărbați:femei – de 1,2%) pentru RM sever; per total, *sex ratio* este de 1,5. Afectarea mai frecventă a sexului masculin se datorează atât numărului mare de gene de pe cromozomul X care determină RM (la bărbații XY), cât și menținerii acestor gene în populație (prin femeile purtătoare capabile de reproducere).

B. Etiologia retardului mental

Stabilirea etiologiei RM este o acțiune dificilă și reprezintă o provocare continuă pentru toți cei care se ocupă de această problemă. Numai identificarea cauzelor poate ajuta la stabilirea unui prognostic și a unui sfat genetic corect; în plus, va permite organizarea corespunzătoare a testelor de laborator și alcătuirea unui plan adecvat de îngrijire și tratament.

1. Cauzele genetice, epigenetice și de mediu ale retardului mental

Mai multe studii etiologice ample au stabilit că RM, ca perturbare a formării și funcționării creierului, poate fi produs de cauze genetice, epigenetice sau de mediu (mezologice), dar în circa 56% dintre cazurile de RM etiologia rămâne necunoscută, fiind probabil multifactorială (RM idiopatic) (figura 16.1). Acest procent este în regresie continuă, datorită acumulării cunoștințelor și perfecționării metodelor de investigație cromozomiale, moleculare și neuroimagistice; de exemplu, aplicarea metodelor de citogenetică moleculară a dus la identificarea unor leziuni submicroscopice subtelomerice în 4-6% dintre cazurile considerate inițial a fi RM idiopatic.

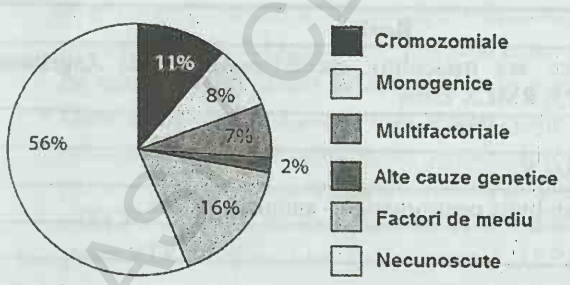


Figura 16.1. Cauzele retardului mental
(Adaptat după Stevenson *et al.*, 2003)

Factorii de mediu implicați în producerea RM sunt reprezentați de diferite agresiuni (traume – hemoragii intracraniene, hipoxie; agenți toxici – în special alcoolismul matern; infecții cu citomegalovirus, rubeolă, toxoplasma etc.; carențe nutriționale) care acționează pre-, peri- sau postnatal. Complicațiile prematurității și agresiunile externe explică 10% dintre formele de RM ușor și 20% dintre cazurile de RM sever.

Factorii genetici reprezintă aproximativ 28% dintre cauzele RM. Convențional, formele genetice de RM sunt subdivizate în două categorii majore – *RM sindromic*, asociat cu anomalii clinice, radiologice, metabolice sau biologice și *RM non-sindromic (nespecific)*, în care deficitul cognitiv reprezintă singura manifestare a bolii. Deși această diferențiere este utilă în scopuri clinice, studiile recente genotip-fenotip și urmărirea clinică atentă a pacienților indică estomparea granițelor dintre formele sindromice și non-sindromice, multe cazuri de RM nespecific fiind recunoscute ca forme sindromice.

Factorii genetici răspunzători de producerea RM sunt reprezentați de anomalii cromozomiale și mutații monogenice transmise mendelian; ereditatea multifactorială a fost implicată în explicarea RM idiopatic (vezi capitolul 14.C), pornind de la premiza implicării unor gene multiple, precum și a unor factori de mediu în determinismul funcțiilor cognitive.

- *Anomaliile cromozomiale* sunt cea mai frecventă cauză de RM sever, întâlnindu-se la circa 40% dintre acești pacienți; ponderea anomaliilor cromozomiale la bolnavii cu RM ușor este însă de numai 10%. În ciuda aplicării pe scară largă a diagnosticului prenatal la femeile de peste 35 ani, sindromul Down rămâne cea mai importantă cauză singulară de RM. Alte anomalii cromozomiale numerice și structurale sunt mult mai rar întâlnite, dar, luate împreună, anomaliile cromozomiale vizibile citogenetic se întâlnesc la 1 din 7 indivizi cu RM sever. După introducerea tehnicilor FISH și mai recent a tehnicii microrețelelor CGH de rezoluție înaltă s-a dovedit că microdelețiile și anomaliile cromozomiale criptice (în special rearanjările subtelomerice și interstițiale) reprezintă o cauză la fel de importantă de RM. Exemple de *microdelеții cromozomiale* asociate cu RM sunt sindroamele Prader-Willi și Angelman, ca și sindromul Williams-Beuren. *Rearanjările subtelomerice*, ca grup

distinct, sunt responsabile de 5-7% din toate cazurile de RM, o frecvență intermediară între trisomia 21 și sindromul X fragil. Circa jumătate din cazuri sunt reprezentate de deleții *de novo*, iar jumătate de anomalii de structură neechilibrate ce rezultă prin segregarea unor anomalii cromozomiale echilibrate prezente la unul dintre părinți; această ultimă categorie are un risc mai mare de recurență comparativ cu celelalte anomalii cromozomiale.

- *Mutațiile monogenice* au fost identificate în 5-10% dintre formele de RM ușor și 20-25% dintre cazurile cu RM sever, cea mai frecventă boală monogenică asociată cu RM fiind sindromul X fragil. În afara unor boli metabolice (1-5%), tulburări de dezvoltare (holoprozencefalia) sau boli neuromusculare (distrofia musculară Duchenne[2]), în această categorie sunt incluse numeroase[3] sindroame cu anomalii congenitale multiple (ACM) asociate cu RM (ACM/RM sau, în limba engleză, MCA/MR). Studiile moleculare în diferite forme de RM sindromic sau RM nespecific familial au permis identificarea unor gene implicate în realizarea funcțiilor cognitive la om (vezi caseta 16.1).

Cele mai multe gene singulare care afectează funcțiile cognitive au fost descoperite pe cromozomul X (82 gene la ultima evaluare din 2007), probabil datorită bogăției în gene a acestui cromozom, dar și ușurinței în identificarea familiilor cu retard mental cu mod de transmitere legat de X. Prin urmare, este posibil ca majoritatea genelor autozomale ce determină RM să-și aștepte identificarea. Identificarea genelor autozomal dominante este însă complicată de faptul că formele de RM dominant sever sunt rareori familiale (în general indivizii afectați nu se reproduc), iar formele dominante non-sindromice sunt greu de identificat clinic. De asemenea, heterogenitatea genetică a RM autozomal recesiv și raritatea arborilor genealogici mari și a consangvinității limitează identificarea genelor ce determină RM autozomal recesiv. Până în prezent au fost identificate doar 5 gene ce determină RM autozomal recesiv non-sindromic (*PRSS12* pe 4q26, *CRBN* pe 3p26, *CC2D1A* pe 19p13.12, *GRIK2* pe 6q16.3 și *CC2D2A* pe 4p15.33-p15.2).

Datele moleculare ne arată că diferite mutații în aceeași genă pot produce atât forme sindromice, cât și forme nesindromice de RM. Acest lucru este foarte important, deoarece multe cazuri de RM idiopatic pot fi determinate de mutații în genele care au fost deja identificate.

- Anomaliile epigenetice au fost identificate recent ca fiind implicate în determinismul RM. Procesele epigenetice au o legătură strânsă cu disfuncția neurologică. Amprentarea genomică prin metilarea ADN din regiunea 15q11-q13 poate duce la sindroamele Prader Willi/Angelmann, iar expansiunea trinucleotidică a genei *FMR1* determină hipermetilarea ADN cu blocarea genei și apariția sindromului X fragil. În plus față de aceste defecte genetice specifice, mutațiile genelor implicate în mecanismul epigenetic pot determina RM (vezi tabelul 16.2).
- *Malformațiile SNC.* Numeroase malformații congenitale ale SNC ce conduc la RM (precum defectele de tub neural, agenezia de corp calos sau malformația Dandy-Walker) sunt determinate multifactorial. Prin definiție, RM se referă la un creier anormal funcțional, fapt care nu se asociază obligatoriu cu anomalii anatomice. Totuși, complexitatea proceselor embriologice prin care se formează SNC poate genera erori de morfogeneză. După

Tabelul 16.2. Mutații în gene implicate în mecanismul epigenetic ce produce RM

Gena	Locus	OMIM	Boala
MECP2	Xq28	* 300005	Rett (clasic, variant, sex masculin); encefalopatie severă; Angelman; RMLX sindromic 13; RMLX Lubs
RPS6KA3	Xp22	+ 300075	Coffin Lowry
ATRX	Xq13	* 300032	Alfa talasemia – RMLX
DNMT3B	20q11	* 602900	Deficit imun – instabilitate centromerică – anomalii faciale
CREBBP	16p13	* 600140	Rubinstein Taybi
EP300	22q13	* 602700	Rubinstein Taybi
NSD1	5q35	* 606681	Sotos, Beckwith-Wiedemann
EHMT1	9q34	* 607001	Deleție subtelomerică 9q
JARID1C	Xp11	* 314690	RMLX sindromic
MACROD2	20p12	* 611567	Kabuki
CHD7	8q12	* 608892	CHARGE

2. În ultimele două afecțiuni, RM nu este o trăsătură constantă.
3. În OMIM sunt cuprinse 1.726 de intrări (fenotipuri) ce se caracterizează prin RM (ianuarie 2011).

BCU CLUJ

CASETA 16.1

Bazele moleculare ale funcției cognitive la om

Bazele moleculare ale funcției cognitive la om au început să fie descifrate prin studiul mutațiilor care perturbă acest proces și determină RM. Rezultatele analizelor moleculare sunt foarte dificil de interpretat deoarece mutațiile nu operează direct, ci influențând procesul de dezvoltare; modificările fenotipice consecutive mutațiilor se vor produce așadar la distanță de locul acțiunii, relația dintre fenotip și genotip în RM fiind foarte complexă. În plus, efectul mutațiilor va fi modificat de interacțiunile cu alte gene, greu de descifrat. Și totuși, există speranțe de abordare eficace a bazelor celulare și moleculare ale proceselor cognitive, deoarece, recent, s-a demonstrat, surprinzător, că diferite forme de RM sindromic și nesindromic se produc prin mutații în aceleași gene, cu efecte pleiotrope.

Din rațiuni metodologice, genele implicate în procesele cognitive pot fi împărțite în patru categorii:

- *Gene care codifică proteine membranare de la nivelul sinapselor. Tetraspaninele (molecule ce traversează membrana de patru ori) formează cu integrinele complexe transmembranare cu un rol important în semnalizarea intersinaptică și, prin aceasta, în procesele cognitive; mutații ale genelor ce codifică aceste proteine produc pierderea memoriei la Drosophila, iar la om mutația genei TM4SF2 (transmembrane 4 superfamily type 2) determină o formă de RMLX nespecific. O altă proteină de suprafață, IL1RAPL (IL1*receptor accessory protein like*), a fost implicată în perturbarea cunoașterii la pacienții cu RM nonsindromic. În sfârșit, subunitatea 3 a receptorului pentru glutamat (GRIA3) a fost descrisă recent drept cauză monogenică a RMLX nesindromic ca urmare a analizei punctului de ruptură dintr-o translocație echilibrată (X;12).*
- *Gene care codifică proteine componente ale căilor de semnalizare. S-a demonstrat că mutații în calea de semnalizare RAS se întâlnesc în diferite forme de RM; superfamilia kinazelor RAS include familiile RHO și RAB implicate în reglarea activităților citoscheletului de actină și a veziculelor de exocitoză. Există două categorii de proteine implicate în semnalizare, ale căror mutații sunt implicate în etiologia RM: GTP-aze și kinaze. Exemple de GTP-aze ale căror mutații determină RM nesindromic sunt oligofrenina 1 (OPHN1), inhibitorul tip 1 al disocierii GDP (GDI1) și ARHGEF6 (care mediază schimbul guanin-nucleotidelor). O nouă dovadă a implicării căii RAS în dezvoltarea funcțiilor cognitive a fost adusă de studiul cazurilor de neurofibromatoză 1 asociată cu tulburări de învățare sau RM; se pare că neurofibromina acționează ca un element de control în calea de semnalizare RAS. Mutațiile kinazei PAK3 (componentă a căii de semnalizare RAS) determină RM nesindromic, în timp ce mutațiile genei pentru efectorul citosolic RSK2 (ribosomal S6 kinase) produc atât sindromul Coffin-Lowry (caracterizat prin RM, anomalii faciale și digitale, deformații scheletice progresive), cât și o formă de RM nesindromic. În sfârșit, pierderea funcției kinazei LIMK1 pare a fi responsabilă de RM asociat sindromului Williams.*
- *Gene care codifică proteine reglatoare ale translației. Proteina FMRP – codificată de gena FMR1, care este inactivată prin expansiunea unei repetiții trinucleotidice în sindromul X fragil (FRAXA) – este o componentă a subunității ribozomale mari, fiind implicată atât în controlul producției de proteine la nivelul sinapselor, cât și în exportul ARNm din nucleu; acest fapt ne permite să presupunem că sinteza proteinelor în dendrite este o etapă critică în învățare și memorie.*
- *Gene care codifică factori de transcripție. Mutațiile unor gene ce codifică factori de transcripție afectează expresia altor gene, producând efecte multisistemice și RM. În prezent, se cunosc patru gene – care codifică reglatori transcripționali – implicate în producerea unor afecțiuni cu RM: gena MECP2 situată pe cromozomul X (sindromul Rett), gena FRM2 situată în situsul fragil FRAXE, gena ATRX (situată pe Xp) și gena FOXP2, situată pe cromozomul 7.*

studii mai vechi, bazate pe evaluarea anatomopatologică, frecvența malformațiilor cerebrale la pacienți cu RM era foarte variabilă, între 7 și 17%. Studiile mai recente de neuroimagistică, efectuate prin CT și/sau RMN, au raportat valori între 9 și 60%, în funcție de tehnică (CT sau RMN) și de criteriile de selecție a pacienților; cele mai frecvente sunt lisencefalia, agenezia de corp calos, hipoplazia cerebeloasă ș.a. Cert este că malformațiile cerebrale au o pondere crescută în producerea RM. În plus, trebuie subliniat că erori mai subtile în migrarea neuronală, alinierea și orientarea neuronilor sau mielinizarea axonilor și stabilirea sinapselor nu pot fi încă evidențiate prin tehnicile obișnuite de investigație, dar toate sunt implicate în diferite forme de RM.

În încheierea acestei discuții, subliniem încă o dată că în aproximativ jumătate din cazuri nu se poate stabili o cauză a RM, frecvența RM idiopatic fiind de aproape patru ori mai mare în cazurile de RM ușor (70%) comparativ cu RM sever (20%).

2. Retardul mental legat de X (RMLX)

2.1. RMLX – prevalență, forme clinice, gene

În grupul bolnavilor cu RM există un exces de bărbați afectați (20-40%); acest fenomen s-a corelat cu existența unor familii în care RM se transmite monogenic, recesiv legat de X, și, în final, s-a stabilit că 10-15% dintre toate cazurile de RM sunt produse de mutații ale unor gene situate pe cromozomul X, grupate în categoria *RM legat de X (RMLX)*; ele afectează preferențial băieții și sunt transmise de femei purtătoare, puțin sau deloc afectate.

Pentru a afirma apartenența la acest grup trebuie îndeplinite următoarele criterii specifice:

- cel puțin doi bărbați afectați înrudiți pe linie maternă: doi frați, verișori sau unchi matern-nepot (figura 16.2);
- prezența femeilor cu RM este posibilă;
- transmiterea tată → fiu NU este posibilă.

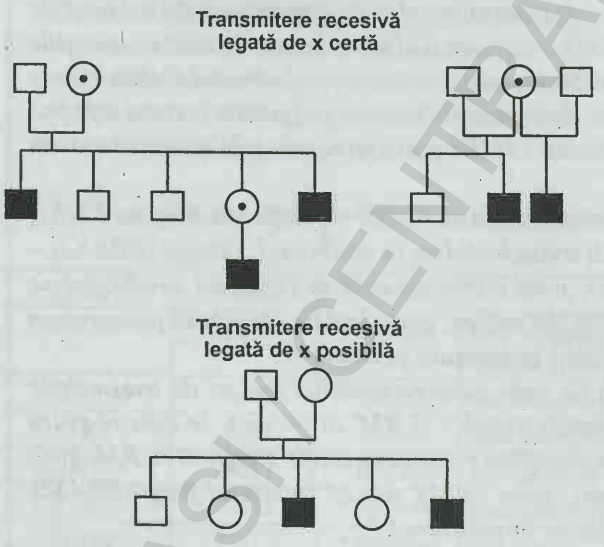


Figura 16.2. Transmiterea recesivă legată de X a unor forme de retard mental

Coexistența în fratrie a doi băieți cu RM fără o cauză identificată trebuie să ducă la suspiciunea unui RMLX, dar nu permite afirmarea sa cu certitudine.

a) Prevalența RMLX

Mutațiile genelor de pe cromozomul X produc circa 10-15% dintre cazurile de RM, de 3-4 ori mai mult decât proporția așteptată după contribuția de ~4% a conținutului genic al cromozomului X la genomul uman. (~818 gene ce codifică proteine pe cromozomul X *versus* 19.586 conținut genomic uman). RMLX afectează 1/600-1/1.000 de bărbați (în aproximativ 15% din cazuri fiind vorba de Sindromul X fragil), reprezentând *prima cauză de RM ereditar*. De aceea, cunoașterea acestor boli este obligatorie pentru medicul practician care, în principiu, trebuie să *suspecteze un RMLX la orice băiat cu RM*, să facă un examen clinic riguros și o anamneză familială cât mai completă, intuind posibilitatea unui risc crescut de recurență în familie.

b) Clasificare, forme clinice

Se deosebesc două categorii de RMLX: specific și nespecific. Numărul de entități descrise și de gene localizate sau clonate până în anul 2007 este prezentat în tabelul 16.3. În clasificările inițiale, RMLX specific includea sindroame malformative, boli neuromusculare, afecțiuni metabolice și boli dominante legate de X (manifeste la fete, letale la băieți). Totuși, ultimele două clase nu se bazează pe aspectul clinic al pacientului, ci pe mecanismul biochimic sau tipul de transmitere. În plus, unele gene care dau boli dominante pot da (prin mutații diferite) și boli recesive. De aceea, la ultima evaluare (2007), specialiștii din domeniu au decis clasificarea RMLX în trei clase în funcție de tabloul clinic:

- sindroame, caracterizate prin anomalii congenitale multiple și defecte în alte organe/țesuturi (dar și incluzând) decât creierul;
- boli neuromusculare, caracterizate prin simptome neurologice sau musculare (epilepsie, distonie, spasticitate, slăbiciune musculară etc.), dar fără malformații;
- entități nespecifice (MRX).

Tabelul 16.3. Forme, entități și gene în RMLX

	Total entități	Gene	
		localizate	clonate
RMLX specific (sindromic)			
* sindroame malformative	98	31	38
* boli neuromusculare	51	16	28
RMLX nespecific	66	50	16
Total RMLX	215	97	82

(*Surse*: XLMR Genes: Update 2007; Chiurazzi, Schwartz, Gecz, Neri, 2008)

Formele specifice de RMLX sunt rare, exceptând **sindromul X fragil**; ele asociază semne clinice ce permit orientarea diagnosticului și permit acordarea unui sfat genetic destul de precis. Formele nespecifice

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY

de RMLX sunt mult mai frecvente; clinic, nu există alte manifestări în afara RM (de obicei uşor sau moderat) şi de aceea pun probleme dificile de recunoaştere şi deci de sfat genetic.

c) RMLX specific

RMLX specific implică, pe lângă RM, prezenţa altor manifestări care permit încadrarea pacientului în patru subgrupe: sindroame malformative, boli neuromusculare, afecţiuni metabolice sau boli dominante legate de X (figura 16.3).

Sindroamele malformative cu RMLX asociază semne morfologice sau anomalii de creştere care permit individualizarea lor. Au fost descrise, până în prezent, 98 de sindroame, unele observate în mai multe familii, altele fiind raportate doar într-o singură familie. Cele mai frecvente sunt boli care nu evoluează („*fixe*"), dar expresia lor depinde de vârsta pacientului (de exemplu, microcefalia, hipostatura, macroorhidismul etc.) şi diferă deseori de la un pacient la altul.

> Semnele evocatoare pentru un posibil *sindrom cu RMLX* sunt: talia mică sau înaltă, obezitatea, cifoza sau scolioza (± malformaţii vertebrale), microcefalia sau macrocefalia, părul distrofic sau anormal implantat, dismorfia facială, ptoza, cecitatea (± malformaţii oculare), dinţii cu morfologie anormală, anomaliile extremităţilor, micropenisul, scrotul hipoplazic sau „în şal", microorhidia sau macroorhidia, ginecomastia, imperforaţia anală sau anusul antepozat, constipaţia cronică, ihtioza, psoriazisul, *cutis laxa*. Pentru stabilirea tipului individual de sindrom RMLX se va recurge la algoritmi de diagnostic, sisteme informatizate de ajutor de diagnostic (OMD, POSSUM) sau Internet (OMIM, ORPHANET, GENECLINICS etc.).

Pe baza manifestărilor clinice, sindroamele malformative cu RMLX se pot clasifica la rândul lor în mai multe categorii, menţionate în tabelul 16.4.

Formele de RMLX cu o componentă neuromusculară. Pe primul-plan stau manifestările neurologice sau musculare, izolate sau asociate: hipotonie precoce şi importantă, paraplegie spastică, ataxie, nistagmus, neuropatie senzitivo-motorie, mişcări anormale, dizartrie, comiţialitate severă şi refractară, adducţie fixată a policelui sau picior strâmb varus. Neuroimagistica are o contribuţie importantă la stabilirea diagnosticului, putând evidenţia: lisencefalie, atrofie cerebrală, dilataţii ventriculare, agenezie de corp calos, hipoplazie cerebeloasă ş.a. (vezi tabel 16.5).

Afecţiunile metabolice asociate cu RMLX: cele mai cunoscute şi mai frecvente sunt sindroamele Lesh-Nyhan, Menkes, Lowe, Hunter (vezi tabel 16.6).

Bolile dominante legate de X cu RM se caracterizează prin faptul că numai femeile heterozigote (X^AX^n) sunt afectate, deoarece fetuşii hemizigoţi (X^AY) mor *in utero*. În această categorie se încadrează sindromul Rett, Incontinentia pigmenti Bloch-Sulzberger, sindromul Goltz, sindromul orofaciodigital (OFD) tip 1, asociaţia MIDAS şi sindromul Aicardi (vezi tabel 16.7).

d) RMLX nespecific

RMLX nespecific este relativ frecvent şi nu implică asocierea altor anomalii. În principiu, orice deficienţă mentală cu etiologie neclară prezentă la un băiat este suspectă de a fi un RMLX nespecific, chiar dacă la prima vedere nu sunt şi alte cazuri familiale. Clinic, este vorba de un RM uşor sau moderat ce apare la un băiat care prezintă *hipotonie* inexplicabilă în primele luni de viaţă, *microcefalie* discretă, deficit statural uşor, câteva *crize convulsive* sau comiţialitate refractară; toate acestea reprezintă „un fundal discret" pe care se proiectează RM.

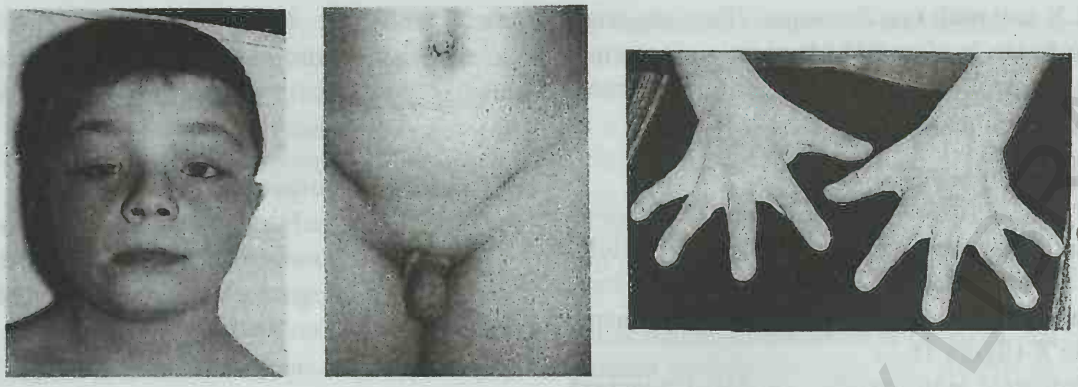
e) Studiul genelor implicate în RMLX

A fost o preocupare constantă în ultimii 10 ani, deoarece deschide perspectiva înţelegerii proceselor moleculare care stau la baza funcţiilor cognitive umane şi permite precizarea diagnosticului şi realizarea unui sfat genetic corect şi eficient.

- În formele de RMLX specific (149 de entităţi) au fost localizate 47 de gene şi clonate 66. Studiul genelor clonate a permis stabilirea faptului că proteinele codificate au mai multe ţinte moleculare şi astfel se explică efectele pleiotrope. S-au evidenţiat frecvent mai multe alele, rezultate prin mutaţii diferite în aceeaşi genă, care deseori produc manifestări clinice diferite; de exemplu, mutaţii diferite în gena *L1CAM* (care codifică o proteină de adeziune) produc: **HSAS** – hidrocefalia prin stenoza apeductului Sylvius; **MASA** – o formă de retard mental asociată cu adducţia policelui, fără hidrocefalie; **SPG1** – o formă de paraplegie spastică asociată cu RM; o formă de RMLX nespecifică. De asemenea, s-a descris, în unele sindroame, o heterogenitate genetică de locus (nealelică); de exemplu, **sindromul FG** (caracterizat prin RM, constipaţie cronică sau malformaţii anorectale şi adesea macrocefalie) este produs de mutaţii în gene diferite, care se manifestă clinic identic.
- În RMLX nespecific au fost izolate şi clonate 16 gene, alte 50 fiind localizate; s-a constatat că aceste gene au o acţiune limitată numai la SNC.

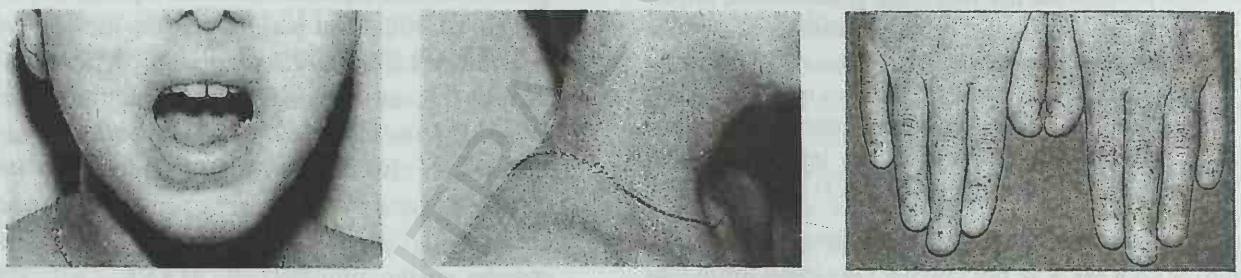
Localizarea subcelulară şi funcţia biologică a produşilor proteici ai genelor RMLX sunt prezentate în figura 16.4.

Tabelul 16.8 exemplifică forme sindromice de RMLX pentru care au fost identificate genele implicate,



Sindrom Aarskog (facio-digito-genital, locus: Xp11.21; gena FGD1)
(S.A. 11 ani, RM, bose frontale, hipertelorism, fante palpebrale anti-mongoloide, ptoză palpebrală dr., filtrum lung, buza inferioară eversată, urechi jos situate, schiță de sindactilie, scrot în șal, un unchi matern cu RM)

Sindrom Coffin-Lowry (locus: Xp22.1; gena RSK2)
(P.M., 9 luni, întârziere de dezvoltare, hipotonie, dismorfie facială : bose frontale, hipertelorism, fante palpebrale antimongoloide, gură mare cu buze eversate, hipodonție – degete conice)



Sindrom diskeratosis congenita (locus: Xq28, gena DKC1)
(M.D., 14 ani, RM ușor, microcefalie, piele pigmentată, distrofia unghiilor, leukoplakia mucoasei bucale)

Sindrom Menkes (locus: Xq13, gena ATP7A)
(D.N., 6 luni, retard de dezvoltare, hipotonie, convulsii ; păr rar, hipopigmentat, pili torti micrognatie, piele uscată, pigmentată neregulat; cupru seric și ceruloplasmina – scăzute)

Figura 16.3. Diferite sindroame și boli care se încadrează în categoria retardului mental legat de X specific
(colecția Centrului de genetică medicală Iași)

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 16.4. Categorii clinice de RMLX sindromic, funcție de anomalii asociate

SNC	Agenezie corp calos LX, Aicardi, Bertini, Brooks-Wisniewski-Brown, Chassaing, Christianson, Cornelia de Lange XL, Deficit piruvat-dehidrogenază, Displazie spondilo-epi-metafizară, Fichera, Graham, Gustavson, Heterotopie nodulară periventriculară, Hidrocefalie-agenezie cerebeloasă, Hidrocefalie – calcificare ganglioni bazali LX, Hoyeraal-Hreidarsson, Kang, lisencefalie LX, Lujan, MASA-hidrocefalie LX, Menkes, MIDAS, Miopatie miotubulară, Opitz FG, Oro-facio-digital I, Pettigrew, Proud, Reish, Tariverdian, VACTERL-hidrocefalie,
Convulsii	Aicardi, Armfield, Smith-Fineman-Myers, Borjeson-Forssman-Lehmann, Christianson, Chudley, Cornelia de Lange XL, Displazie spondilo-epi-metafizară, Heterotopie nodulară periventriculară, Hipoparatiroidism LX, Homfray, Jones, MEHMO, Nascimento, Pseudoobstrucție intestinală idiopatică cronică, Pettigrew, Prieto, Rud, Stocco dos Santos, Tranebjaerg I, Wei, Wilson
Ocular	Aicardi, ANOP1, Armfield, Brooks-Wisniewski-Brown, Cerebral-cerebelar-colobom, Cerebrooculogenital, Chassaing, Goltz, Graham, Hipoparatiroidism LX, Incontinentia pigmenti, Juberg Marsidi, Lenz, Lowe oculo-cerebro-renal, MIDAS, Nance Horan, Norrie, Oculo-facio-cardio-dental, Reish, Rud, Seemanova, Wittwer
Surditate	Abidi, Juberg-Marsidi, Graham, Opitz FG, Oosterwijk, Oto-palato-digital I, Schimke
Dentar	Golabi-Ito-Hall, Goltz, Incontinentia pigmenti, Nance-Horan, Oculo-facio-cardio-dental, Oro-facio--digital I, Pallister W, Prieto
Despicături faciale	Aicardi, Armfield, Cerebropalatocardiac, Cranioorodigital, Goltz, Hall, Lenz, Melnick-Needles, Oro-facio-digital I, Otopalatodigital I și II, Pallister W, Reish, RMLX-facies hipoton, Siderius-Hamel, Simpson-Golabi-Behmel, Snyder-Robinson, Telecantus – hipospadias, VACTERL-hidrocefalie,
Facies grosier	Atkin-Flaitz, ATR-X, Coffin-Lowry, Homfray, Hunter, Shashi, Simpson-Golabi-Behmel
Cardiac	Cerebropalatocardiac Hamel, Distrofie buloasă ereditară LX, Golabi-Ito-Hall, Lenz, Lujan, MIDAS, Oculo-facio-cardio-dental, Opitz G/BBB, RMLX-facies hipoton, Simpson-Golabi-Behmel, Telecantus – hipospadias,
Ectodermal	Cantu, Disfuncție buloasă ereditară LX, Dyskeratosis congenita, Fitzsimmons, Golabi-Ito-Hall, Goltz, Incontinentia pigmenti, Menkes, MIDAS, Oosterwijk, Oro-facio-digital I, Porteous, Rud, Tranebjaerg I, Van den Bosch, Young-Hughes
Gastro-intestinal	Armfield, MIDAS, Opitz FG, Prieto, Reish, Simpson-Golabi-Behmel, Sutherland-Haan, VACTERL-hidrocefalie
Genito-urinar	Aarskog, Anomalii de arc branhial LX, Armfield, ATRX, Borjeson-Forssman-Lehmann, Cerebrooculogenital, Chudley-Lowry, Disfuncție buloasă ereditară LX, Dyskeratosis congenita, Goltz, Holmes-Gang, Juberg-Marsidi, Lenz, Miopatie miotubulară, Opitz FG, Opitz G/BBB, Oro-facio-digital I, Prieto, Proud, Reish, RMLX-hipospadias, RMLX-facies hipoton, Seemanova, Simpson-Golabi-Behmel, Sutherland-Haan, Telecantus – hipospadias, Urban, VACTERL-hidrocefalie, Wilson-Turner, Wittwer
Anomalii endocrine	Akesson, Ahmad, Borjeson-Forssman-Lehmann, Cabezas, Hipoparatiroidism LX, Hockey, MEHMO, Miles-Carpenter, Tariverdian, van Esch, Vasquez, Young-Hughes
Hematologic	Dyskeratosis congenita, Hoyeraal-Hreidarsson, Martin-Probst
Deficit imun	Chudley, Hoyeraal-Hreidarsson, Oosterwijk, Roifman, Wilson
Scheletic	Aarskog, Anomalii de arc branhial LX, Apak, Atkin-Flaitz, ATRX, Borjeson-Forssman-Lehmann, Brooks, Carpenter, Chassaing, Christian, Christianson, Chudley-Lowry, Coffin-Lowry, Cranioorodigital, Disfuncție buloasă ereditară LX, Displazie fronto-metafizară, Displazie spondilo-epi-metafizară, Fitzsimmons, Goltz, Graham, Gustavson, Hidrocefalie – calcificare ganglioni bazali LX, Holmes-Gang, Hunter, Hyde-Forster, Kang, Lenz, Lowe oculo-cerebro-renal, Lujan, Melnick-Needles, Miles-Carpenter, Nance-Horan, Oosterwijk, Opitz FG, Oro-facio-digital I, Oto-palato-digital I și II, Pallister W, Pettigrew, PPM-X, Prieto, Proud, Reish, RMLX-facies hipoton, RMLX-psoriazis, Roifman, Say-Meyer, Simpson-Golabi-Behmel, Smith-Fineman-Myers, Snyder-Robinson, Stevenson, Stocco dos Santos, Sutherland-Haan, Urban, VACTERL-hidrocefalie, Van den Bosch, Vitale, Wieacker-Wolff, Wei, Wittwer
Obezitate	Ahmad, Atkin-Flaitz, Chudley-Lowry, Borjeson-Forssman-Lehmann, Cabezas, MEHMO, Nascimento, Shashi, Vasquez, Wilson-Turner, Young-Hughes
Letalitate la copil mic	Adreno-leuco-distrofia, Arts, Bertini, Cerebral-cerebelar-colobom, Chassaing, Deficit de ornitin-transcarbamilază, Deficit de piruvat-dehidrogenază, Disfuncție buloasă ereditară LX, Gustavson, Hidrocefalie – agenezie cerebeloasă, Holmes-Gang (RMLX – facies hipoton), Lisencefalia legată de X, Menkes, Miopatia miotubulară, Oto-palato-digital I I, Paine, RMLX – hipotonie – infecții recurente, Spasme infantile legate de X, Spectrul MASA – hidrocefalie LX, VACTERL-hidrocefalie

Tabelul 16.5. Forme de RMLX sindromic cu componentă neuro-musculară

Adrenoleucodistrofie	Cvadripareză spastică, afectarea vederii, ataxie, demenţă
Aldred	Retinită pigmentară, microcefalie
Allan-Herndon-Dudley	Hipotonie severă, contracturi articulare, paraplegie spastică, atrofii musculare severe, nistagmus, T3 şi T4 seric crescut
Arena	Paraplegie spastică, ataxie, titubaţie, depozite Fe în ganglionii bazali
Arts	Deces precoce, hipotonie, ataxie, surditate, pierderea vederii, infecţii recurente
Ataxie cerebeloasă	Ataxie (spino) cerebeloasă, ataxie, nistagmus, dizartrie, RM uşor
Bertini	Ataxie, hipotonie, infecţii recurente
Charcot-Marie-Tooth (CMT) LX2	Neuropatie senzorială şi motorie (iniţial numită Ionasescu)
CMT LX Cowchock Fishbeck	Neuropatie senzorială şi motorie, surditate
Deficit transportor creatină	Convulsii, hipoplazie etaj mijlociu al feţei, urechi în cupă, police gros/scurt, hipermobilitate articulară
Danon	Cardiomiopatie hipertrofică vacuolară, afectare muşchi proximali
Distrofie musculară Duchenne	Pseudohipertrofia musculaturii gambei, enzime musculare crescute, afectare musculară progresivă, pierderea reflexelor, contracturi
EFMR	RM şi epilepsie numai le femei
Encefalopatie mitocondrială	Deficit complex I
Fitzsimmons	Picior scobit, hiperkeratoză palme/plante, unghii distrofice, paraplegie spastică
Garcia	Epilepsie, dificultăţi de învăţare, macrocefalie, comportament agresiv
Goldblatt	Paraplegie spastică, nistagmus, atrofie optică, hipoplazie muşchi
GRIA3 inactivare	Afectare bipolară, convulsii la sugar
Gustavson	Atrofie optică cu cecitate, surditate, epilepsie, contracturi articulare, deces precoce
Hamel	Cecitate, convulsii, hipomielinizare, spasticitate, deces precoce
Hildebrand	Surditate congenitală severă, fără dismorfie, creştere normală
HSAS (spectru MASA)	Hidrocefalie cu stenoză apeduct Sylvius
Hiperreflexie şi epilepsie	Hipertonie permanentă accentuată de cel mai mic stimul, hipersensibilitate senzorială, convulsii tonice provocate de stimulare tactilă
Lesch Nyhan	Paralizie cerebrală, coreoatetoză, automutilare
LISX/SCLH	Lisencefalie şi epilepsie la băieţi, heterotopie laminară subcorticală la unele fete
MAO-A deficit	Comportament agresiv, tulburare în metabolismul monoaminelor
MECP2 duplicaţie	Hipotonie, infecţii recurente, spasticitate şi incapacitatea de a merge, limbaj absent, convulsii, fără microcefalie
Miopatie miotubulară	Hipotonie severă, areflexie, afectare musculară generalizată
Mohr-Tranebjaerg	Surditate, cecitate, ataxie, paraplegie spastică
Norrie	Displazie şi degenerare oculară, surditate instalată la adult
OPA2	Atrofie optică, reflexe anormale, dizartrie, tremor
OTC deficit	Hiperamoniemie
Paine/Seemanova	Diplegie spastică, convulsii mioclonice, hipoplazie cerebeloasă
Passos Bueno	Paraplegie spastică, hipoplazie musculară, RM sever
Pelizaeus-Merzbacher	Spasticitate, ataxie cerebeloasă, parkinsonism
PGK1 deficit	Mioglobinurie, epilepsie, anemie hemolitică
Piruvat DH sub-unitate E1α deficit	Acidoză lactică, ataxie
Plott	Facies inexpresiv, stridor, paralizie abductor laringian
Polimicrogirie perisylviană bilateral	Paralizie pseudobulbară cu dizartrie şi disfuncţie oro-faringo-glosică, convulsii atone şi tonico-clonice, polimicrogirie cu cortex nestratificat/simplificat 4 straturi
Rett	Pierderea limbajului şi a mişcărilor cu sens, ataxie, autism, demenţă, microcefalie
Reyniers	Coreoatetoză, dizartrie, degenerare retiniană, epilepsie, psihoză
SCAX2	Ataxie, tremurături ale capului, paralizie unilaterală nerv cranian VI, spasticitate şi rigiditate extrapiramidală, atrofie cerebeloasă, deces precoce
SCAX3/ Schmidley	Hipotonie, ataxie, surditate senzorineurală, atrofie optică, deces precoce
SPG16	Cvadriplegie, afazie motorie, vedere redusă, disfuncţie vezicală şi intestinală
Tranebjaerg II	Dispraxie, ataxie, convulsii, pes equinovarus, macroorhidism

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Vles	Agenezie corp calos, cvadripareză spastică, contur neregulat ventriculi laterali
Waisman-Laxova	Parkinsonism, convulsii, degenerare ganglioni bazali
West, spasme infantile	Spasme infantile, hipsaritmie
Wieacker-Wolff	Atrofia musculaturii distale, contracturi, dispraxie muşchi oculari şi faciali
XMRE	Convulsii atonice şi tonico-clonice generalizate, RM moderat, EMG şi VCN normal

Tabelul 16.6. Forme de RMLX sindromic cu componentă metabolică

(modificat după Stevenson, 2000)

Adrenoleucodistrofie	Insuficienţă suprarenaliană, pigmentare cutanată difuză, paraplegie spastică, deteriorare neurologică progresivă şi dementă, creşterea acizilor graşi cu lanţ lung în plasmă
Deficit glicerol kinază (GSK)	Hipostatură, hipogonadism hipogonadotropic, osteoporoză, fracturi, astenie musculară, spasticitate şi convulsii când GSK este parte a unui sindrom de gene contigui; GSK izolată poate fi asimptomatică
Lesch-Nyhan	Spasticitate, coreoatetoză, automutilare, hiperuricemie
Lowe	Hipostatură, cataractă, hipotonie, aminoacidurie, afectare renală progresivă
Menkes	Deficit de creştere, păr rar/creţ/sârmos, hipotermie, paloare, mişcări limitate, hipertonie, convulsii, metafize evazate, artere tortuoase, deces în copilărie
Deficit MAOA (mono-amin-oxiudază A)	Comportament agresiv, mişcări repetitive ale mâinilor
Mucopolizaharidoză IIA	Macrocefalie, hipostatură, facies grosier, hepatosplenomegalie, hernii, rigiditate articulară, piele groasă, hirsutism, tulburări de comportament
Deficit OCT (ornitin-transcarbamilază)	Hiperamoniemie cronică sau intermitentă, microcefalie, vărsături induse de proteine, letargie, ataxie, convulsii
Deficit fosfo-glicerat-kinază	Facies inexpresiv, astenie, scăderea reflexelor osteo-tendinoase profunde, convulsii, mioglobinurie, anemie hemolitică
Deficit piruvat-dehidrogenază	Acidoză lactică, microcefalie, hipotonie, ataxie, dizartrie, anomalii sistem nervos central
RMLX-deficit izolat GH	Hipostatură, ginecomastie, deficit hormon de creştere
RMLX-panhipo-pituitarism	Hipostatură, hipogenitalism, şa turcică mică, deficit hormonal al hipofizei, tiroidei, suprarenalei şi gonadelor
RMLX-aplazie tiroidiană-cutis verticis girata	Hipostatură, cutis girata pe scalp, mixedem datorită aplaziei tiroidiene, diastasis recti, deviere cubitală a mâinilor, afazie
RMLX-deficit TBG	Hipostatură, deficit TBG (globulina de legare a tiroxinei)

Tabelul 16.7. Forme de RMLX sindromic cu manifestare la femei

(după Stevenson, 2000)

Aicardi (OMIM % 304050)	Disgenezie oculară, retinopatie lacunară, anomalii costovertebrale, agenezie de corp calos, convulsii
Goltz (OMIM # 305600)	Cataractă, disgenezie oculară, zone liniare de aplazie dermică, hernierea ţesutului adipos, unghii distrofice, anomalii păr şi dinţi, anomalii vertebrale, defecte reducţionale membre, anomalii genito-urinare
Incontinentia pigmenti (OMIM ^ 308310)	Vezicule cutanate, leziuni verucoase, hiperpigmentare neregulată, microcefalie, anomalii oculare, oligodonţie, dinţi cu formă anormală, spasticitate, convulsii
MIDAS (OMIM # 309801)	Microftalmie, disgenezie oculară, opacifiere corneeană, aplazie dermică, disgenezie corp calos, defecte cardiace, cardiomiopatie
Oro-facio-digital (OMIM # 311200)	Păr rar pe scalp, distopia cantorum, aplatizarea etajului mijlociu al feţei, aripi nazale hipoplazice, frenule orale aberante şi hipertrofice, despicături şi pseudodespicături intraorale, hamartoame linguale, brahidactilie, sindactilie, clinodactilie, anomalii structurale cerebrale, rinichi polichistici
Heterotopii nodulare periventriculare (OMIM # 300049)	Heterotopii nodulare subependimare bilateral, convulsii
Rett (OMIM # 312750)	Microcefalie câştigată, regresie a dezvoltării, ataxia trunchiului, mişcări repetitive ale mâinilor, trăsături autistice
RMLX-epilepsie (OMIM # 300088)	Regresia dezvoltării, mişcări stereotipe ale mâinilor, convulsii

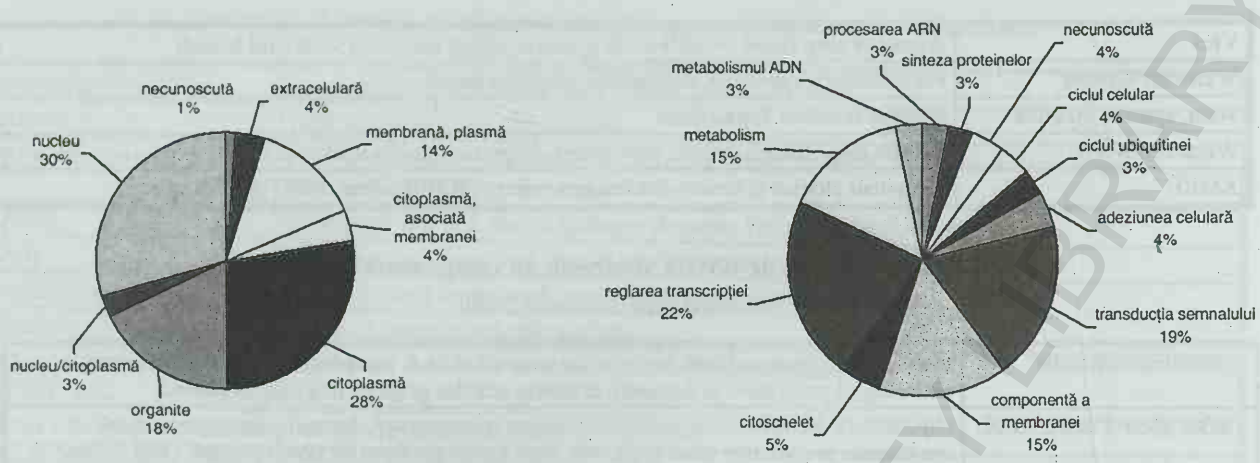


Figura 16.4. Diagrame reprezentând (a) localizarea subcelulară şi (b) funcţia moleculară a proteinelor codificate de genele RMLX cunoscute

(după Chiurazzi *et al.*, 2008)

iar tabelul 16.9 enumeră genele implicate în producerea RMLX nespecific. Aşa cum se observă, mutaţiile unor gene (precum *RSK2*, *ARX*, *FACL4* sau *MECP2*) sunt implicate atât în producerea atât a unor forme sindromice, cât şi a unor forme nespecifice de RM.

Deşi anumite gene (precum FMR2, MECP2, ARX) sunt considerate gene majore pentru RMLX, datorită numărului mare de mutaţii descrise, contribuţia acestora la RM ar putea fi supraestimată datorită faptului că au fost izolate mai devreme (1996, 1999 respectiv 2002) şi astfel au fost identificaţi mai mulţi indivizi afectaţi. Totuşi, este posibil ca aceste gene să fi fost identificate mai devreme pentru că au o contribuţie majoră; este nevoie de testarea sistematică a unui număr mare de pacienţi pentru toate sau cât mai multe gene RMLX posibile pentru a stabili contribuţia lor la RM.

2.2. *Sindromul X fragil (FXS)*

Sindromul X fragil reprezintă cauza cea mai frecventă de RM ereditar şi principala formă genetică de autism. FXS este transmisă ereditar dominant legat de X şi este produs prin *expansiunea trinucleotidului CGG* situat în gena *FMR1* de pe cromozomul X (în banda Xq27.3); această expansiune va produce blocarea expresiei genei şi absenţa proteinei FMR necesară dezvoltării neuronale normale. În mod normal promotorul genei *FMR1* are 6-54 de repetiţii; depăşirea acestui prag (55-200 repetiţii) produce o **premutaţie** şi purtătorii ei nu sunt afectaţi; peste 200 de repetiţii se realizează o **mutaţie completă** şi starea de boală. Mutaţia este găsită la 1:2.000 de bărbaţi şi 1:4.000-6.000 femei; frecvenţa premutaţiilor în populaţia generală este de 1/130-250 femei şi 1/250-800 bărbaţi.

a) Tablou clinic

Tabloul clinic caracteristic bolii apare la persoanele cu mutaţie completă (de obicei la bărbaţi), dar există modificări fenotipice şi la unele persoane cu premutaţie.

Fenotipul în cazul mutaţiei complete. La *copii*, tabloul clinic este foarte nespecific, de obicei fiind caracterizat prin întârziere marcată în dezvoltarea limbajului (comparativ cu dezvoltarea motorie, care este relativ normală), hiperactivitate cu deficit de atenţie, elemente de autism (evitarea contactului privirii, stereotipii motorii şi verbale) şi otite repetate.

Fenotipul *bărbaţilor afectaţi* se caracterizează prin triada: dismorfie facială, macroorhidism şi RM moderat cu elemente de autism. *Dismorfia facială* constă în: faţă alungită cu frunte înaltă, urechi mari/proeminente şi prognatism (bărbie proeminentă) (figura 16.5). *Macroorhidismul* (volum testicular mai mare de 40 ml) devine evident postpubertar. Afectarea psihică se caracterizează prin achiziţia tardivă a limbajului, hiperactivitate cu deficit de atenţie, RM moderat şi elemente de autism. În plus, persoanele afectate prezintă sensibilitate crescută la stimuli senzoriali (îi deranjează atingerea sau locurile aglomerate, cu mult zgomot). Marea majoritate a cazurilor asociază pe lângă semnele clasice şi anomalii ale ţesutului conjunctiv (tegumente catifelate, hipermobilitatea articulaţiilor degetelor, subluxaţia policelui, picior plat, prolaps de valvă mitrală)[4]. Uneori se pot asocia convulsii.

Femeile cu mutaţie completă sunt mult mai puţin afectate decât bărbaţii, în special în ceea ce priveşte funcţionarea cognitivă: au un intelect normal sau liminar şi un risc crescut pentru tulburări de învăţare şi/sau de personalitate comparativ cu populaţia generală.

4. Pentru a creşte eficienţa testării genetice, în literatura de specialitate sunt propuse scoruri de diagnostic (specifice pentru adulţi şi copii), care iau în calcul toate elementele clinice menţionate mai sus.

ROMANIAN UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 16.8. Gene implicate în producerea principalelor forme sindromice de RMLX

(după Chelly şi Mandel, 2001)

Boala	Gena	Funcţia proteinei	OMIM
Sindroame cu forme severe de RM			
Adrenoleucodistrofia	*ABCD1*	Transportor membranar peroxizomal din familia proteinelor ABC, implicat în metabolismul acizilor graşi cu lanţ lung	* 300371
Sindromul Coffin-Lowry	*RPS6KA3/ RSK2*	Serin treonin-kinază ribozomală implicată în transducţia semnalului	+ 300075
Sindromul X fragil	*FMR1*	Proteină implicată în procesarea ARNm şi exportul ARNm din nucleu	* 309550
Boala Hunter (mucopolizaharidoza tip II)	*IDS*	Iduronat sulfataza lizozomală implicată în metabolismul glicozaminoglicanilor	# 309900
Sindromul MASA	*L1CAM*	Moleculă de adeziune celulară cu localizare membranară implicată în interacţiunile interneuronale	* 308840
Sindromul Lesch-Nyhan	*HPRT1*	Hipoxantin-guanin-fosforibozil-transferaza 1 citoplasmatică cu rol în metabolismul purinic, cu reciclarea ribonucleo-zidelor	* 308000
Lisencefalia legată de X	*DCX*	Dublucortina citoscheletală, componentă a complexului proteic asociat microtubilor	* 300121
Sindromul Lowe (oculocerebrorenal)	*OCRL1*	Fosfatidil-inozitol-polifosfat-5-fosfataza localizată în complexul Golgi, implicată în transducţia semnalului şi metabolismul lipidelor	# 309000
RMLX asociat cu α-talasemie	*ATRX*	Helicază nucleară implicată în reglarea transcripţiei, repararea ADN, metilarea ADN, recombinarea ADN	* 300032
Sindromul Mohr-Tranebjaerg	*TIMM8A*	Translocază a membranei interne mitocondriale implicată în transportul proteinelor	* 300356
Sindromul Opitz	*MID1*	Midina citoscheletală implicată în ciclul ubicuitinei, proteină asociată microtubulilor	# 300000
Sindromul Rett	*MECP2*	Proteină nucleară de legare metil- CpG cu rol în represia transcripţiei	* 300005
Boala Menkes	*ATP7A*	ATP-ază transportoare de Cu localizată în complexul Golgi şi reticulul endoplasmatic implicată în exportul membranar al Cu	* 300011
Deficienţa OTC	*OTC*	Ornitin-carbamoil-transferază mitocondrială implicată în metabolismul aminoacizilor şi ciclul ureei	* 300461
Sindromul Alport	*FACL4*	Ligază implicată în metabolismul acizilor graşi cu lanţ lung	# 301050
Sindromul spasmului infantil	*ARX*	Proteină homeobox nucleară cu rol de factor de transcripţie	* 300382
Deficienţa piruvat dehidrogenazei	*PDHA1*	Piruvat-dehidrogenaza mitocondrială implicată în metabolismul acetilcolinei şi glicoliză	# 312170
Sindroame asociate cu RM moderat sau inconstant			
Sindromul Aarskog-Scott	*FGD1*	Proteină similară factorilor RHO/RAC (conţine domenii PH, RHOGEF şi FYVE) citoplasmatică implicate în transducţia semnalului şi schimbul Rho guanilk-nucleotid	# 305400
Diskeratosis congenita	*DKC1*	Diskerina nucleară implicate în ciclul celular, procesarea ARNr şi menţinerea telomerelor prin intermediul telomerazei	* 300126
Sindromul Simpson-Golabi-Behmel	*GPC3*	Glipicanul 3 al matricei extracelulare, proteoglican membranar integral, implicat în controlul creşterii şi diviziunii celulare	* 300037
Distrofia musculară Duchenne	*DMD*	Distrofina – o componentă majoră a citoscheletului	* 300377
Incontinentia pigmenti	*IKBKG*	Modulator esenţial al căii NF-κb (inhibitor al stimulatorului genei lanţului uşor k în limfocite B, cu localizare nucleară, implicat în reglarea transcripţiei, inducţia apoptozei, răspunsul imun, cascada NF-κb)	* 300248
Boala Norrie	*NDP*	Norina secretată extracelular, factor de creştere implicat în transducţia semnalului	# 310600
Sindromul Pelizaeus-Merzbacher	*PLP1*	Proteolipid membranar, componentă a mielinei	* 300401
Epilepsia cu heterotopie periventriculară	*FLNA*	Filamina A, proteină citoscheletală implicată în transducţia semnalului, formarea citoscheletului de actină, motilitatea celulară, reglarea pozitivă a cascadei NF-κb	* 300017

BCU IAŞI CENTRALA BIBLIOTECA

Tabelul 16.9. Gene implicate în producerea RMLX nespecific
(după Ropers şi Hamel, 2005)

Simbolul genei	Funcţia
FMR2	Reglator al transcripţiei, posibil implicat în memoria pe termen lung
GDI1	Reglator al depozitelor RAB4 şi RAB5, probabil implicat în maturarea veziculelor sinaptice
PAK3	Reglarea citoscheletului actinic, stimularea creşterii neuritelor
IL1RAPL	Reglator al exocitozei granulelor cu centru dens, posibil modulator al eliberării neurotransmiţătorilor
*RSK2**	Serin-treonin protein kinază, fosforilarea CREB, rol în formarea memoriei pe termen lung
*MECP2**	Atenuarea transcripţiei genelor neuronale
ARHGEF6	Activarea mediată de integrină a Rac şi cdc42, stimularea creşterii neuritelor
TM4SF2	Modularea semnalizării mediate de integrine, creşterea neuritelor, posibil rol în formarea sinapselor
*SLC6A8**	Transportor al creatinei, necesar pentru menţinerea depozitelor de (fosfo)creatină în creier
*ARX**	Factor de transcripţie cu rol posibil în menţinerea subtipurilor neuronale specifice în cortexul cerebral, proliferarea neuronală, diferenţierea neuronilor eliberatori de GABA
*XNP**	Helicază ce se leagă de ADN implicată în remodelarea cromatinei, metilarea ADN şi reglarea expresiei genelor; reglator intrinsec al dimensiunii corticale
*FGD1**	RhoGEF, posibil rol în stimularea creşterii ramificaţiilor neuronale
ACSL4 (FACL4)	Sintetaza a acizilor graşi cu lanţ lung, posibil rol în sinteza şi/sau reciclarea membranei
AGTR2	Receptor pentru angiotensina II exprimat în creier
*PQBP1**	*Polyglutamine-binding*, rol în matisarea ARNm
ZNF41	Reglator al transcripţiei implicat în remodelarea cromatinei
NLGN4	Proteină membranară postsinaptică implicată în inducţia structurilor presinaptice; asociată cu receptorii glutamatergici tip NMDA
FTSJ1	Rol în modificarea ARNt şi translaţia ARN
DLG3	Proteină *„schelă"* postsinaptică asociată cu receptorii glutamatergici tip NMDA
*JARID1C** *(SMCX)*	Rol în remodelarea cromatinei

* Implicate şi în RMLX sindromic. CREB: c-AMP-responsive element-binding protein; NMDA: N-metil-D-aspartat

Manifestări fenotipice asociate premutaţiilor. Majoritatea indivizilor cu premutaţie au inteligenţă normală, dar bărbaţii sunt predispuşi la probleme de atenţie, disfuncţii executive, deficite sociale şi comportament obsesiv-compulsiv. Circa 20% dintre femeile purtătoare ale unor premutaţii FMR1 prezintă *menopauză precoce* (înainte de 40 de ani), comparativ cu 1% dintre femeile populaţiei generale. Femeile cu premutaţie (chiar dacă au ciclu menstrual) prezintă nivele crescute de FSH comparativ cu femeile sănătoase, iar cele cu CGG>70 au nivele scăzute de hormon anti-müllerian. Penetranţa şi vârsta de debut a insuficienţei ovariene primare, ca şi creşterea nivelelor de FSH se corelează non-liniar cu lungimea repetiţiei CGG (expansiunile mai mari sunt asociate cu un risc mai mic).

Unele dintre femeile cu premutaţie şi peste o treime dintre bărbaţii cu premutaţii pot prezenta un sindrom de *neurodegenerare progresivă cu ataxie cerebeloasă şi tremor intenţional* (FXTAS) care debutează la 50-60 de ani şi este caracterizat prin deficite ale memoriei, manifestări parkinsoniene, reducerea sensibilităţii la nivelul extremităţilor inferioare, ataxie şi atrofie cerebrală. Acest fenotip este clinic şi neuropatologic complet diferit de FXS, fiind rezultatul unui „câştig de funcţie" întrucât bărbaţii cu premutaţii prezintă o creştere a nivelului de transcripţie a FMR1. Nivelul final de FMRP este aproape normal şi se pare că tabloul clinic înregistrat la persoanele cu premutaţie se datorează toxicităţii induse de nivelul crescut de ARNm. Luând în considerare prevalenţa alelelor cu premutaţii în populaţia generală, s-a estimat că 1/3.000 de bărbaţi peste 50 de ani din populaţia generală vor dezvolta simptome de FXTAS. Se pare că penetranţa creşte direct proporţional cu vârsta şi cu lungimea repetiţiilor CGG.

b) Genetică

În mod normal, gena *FMR1* conţine (în porţiunea 5'UTR a exonului 1) între 6 şi 54 de repetiţii ale

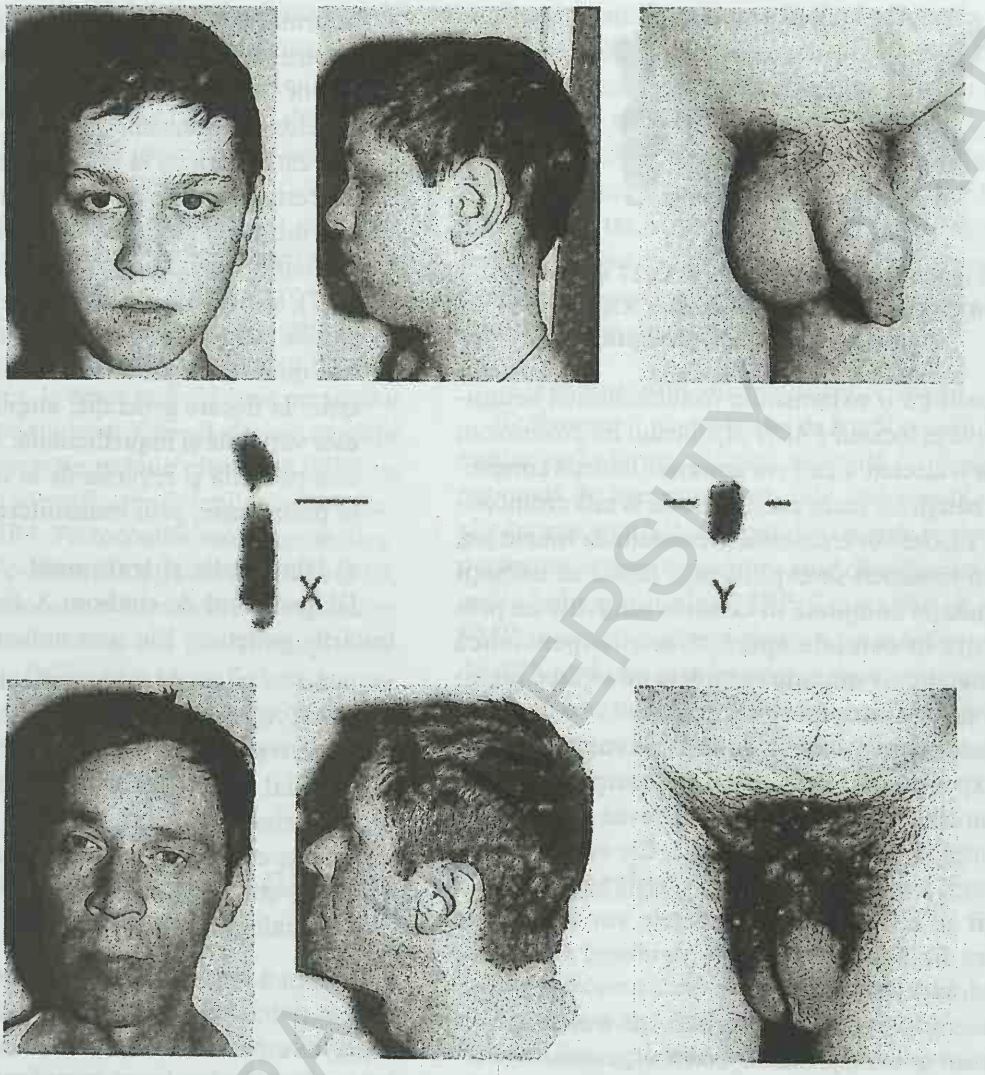


Figura 16.5. Aspectul fenotipic şi citogenetic într-un caz familial de sindrom X fragil

(sus – D. C, 14 ani; RM moderat; tulburări de limbaj; autism; faţă alungită cu frunte înaltă, urechi mari, macroorhidie punertară. Diagnostic: **FRAXA** [confirmare citogenetică şi moleculară] ; jos – unchiul matern, 45 ani, cu sindrom X fragil)

codonului CGG. La bolnavii cu sindromul X fragil alela *FMR1* are peste 200 de repetiţii ale acestui trinucleotid[5] (vezi capitolul 6.B.1.4); aceasta expansiune (mutaţie completă) determină o metilare a ADN, asociată cu dezacetilarea histonelor, şi blocarea expresiei proteinei FMRP, care are un rol important în dezvoltarea axonilor, formarea sinapselor şi circuitelor neuronale, în învăţare şi memorie. Inactivarea alelei *FMR1* expansionate este un exemplu unic de modificare epigenetică locală determinată de variaţia în secvenţa genei.

Metilarea locusului *FMR1* în banda Xq27.3 produce o constricţie a cromatidelor sale ce apare ca *un situs fragil* la microscop (fenomen care a dat numele sindromului).

La persoanele afectate, cultivarea limfocitelor din sângele periferic în condiţii speciale (folosind medii de cultură sărace în acid folic sau conţinând antifolaţi sau alţi inhibitori ai sintezei de ADN) permite evidenţierea unui **situs fragil** situat spre capătul distal al braţului lung al cromozomului X, în regiunea Xq27.3 (figura 16.6) numit **FRAXA**[6]. Evidenţierea situsului fragil se realizează numai la aproximativ 30% din celule, motiv pentru care această metodă nu se mai foloseşte în mod curent la momentul actual.

Sindromul X fragil se transmite dominant legat de X cu expresivitate variabilă şi penetranţă redusă (80% la bărbaţi şi 30% la femei); penetranţa bolii variază în interiorul aceleiaşi familii şi creşte în generaţii succesive (anticipaţie).

5. Există cazuri rare de sindrom X fragil fără expansiunea CGG şi situs fragil, produse prin alte tipuri de mutaţii care inactivează gena FRM1.
6. Există familii rare cu RM uşor şi prezenţa unui situs fragil în Xq27.3, dar fără expansiune la nivelul genei FMR1; aceste familii au o expansiune la nivelul unei gene vecine, FMR2, situată în locusul *FRAXE*. Gena FMR2 prezintă aceeaşi expansiune cu metilare anormală, care duce la abolirea transcripţiei sale.

Figura 16.6. Situsul fragil Xq27 situat pe un cromozom X la o persoană XX (stânga) şi la o persoană XY (dreapta)

- Bărbaţii cu o expansiune trinucleotidică semnificativă în locusul *FMR1* al unicului lor cromozom X vor fi afectaţi. Ei nu vor transmite mutaţia completă la băieţii lor (care moştenesc de la tată cromozomul Y), dar vor transmite premutaţia la fiicele lor; (acest fenomen se explică prin faptul că bărbaţii cu mutaţie completă în celulele sangvine au premutaţie în celulele spermatice şi expansiunea premutaţie → mutaţie completă nu se face niciodată prin transmitere paternă).
- Femeile ce moştenesc de la tată cromozomul X cu expansiunea *FMR1* vor fi heterozigote; datorită fenomenului de inactivare ele pot avea unele semne şi simptome sau vor fi normale. Ele vor transmite X fragil la băieţi sau la fete; băieţii ce primesc X fragil au risc de boală, iar fetele vor fi normale sau cu dizabilităţi intelectuale (de obicei, mai reduse ca bărbaţii).
- *Premutaţiile* se găsesc la bărbaţii *transmiţători normali* şi la majoritatea *femeilor „conductoare"* sănătoase (fără RM) şi heterozigote. Premutaţiile (55-200 CGG) sunt expansiuni nemetilate, active transcripţional şi instabile meiotic. Probabilitatea de expansiune este determinată atât de numărul CGG (alelele de peste 90-100 CGG au un risc de aproape 100% de expansiune la mutaţie completă în următoarea generaţie), cât şi de factori legaţi de structura repetiţiei (absenţa întreruperii repetiţiilor CGG de către secvenţe AGG). Prevalenţa alelelor cu premutaţie > 54 CGG în populaţia generală este estimată la 1/259 femei şi 1/813 bărbaţi.
- Trecerea de la premutaţii la mutaţii complete nu survine decât pe cale maternă, fiind un eveniment probabil prezigotic limitat la ovogeneză (figura 16.7), spermatogeneza fiind incapabilă să menţină alelele cu mutaţie completă. De regulă, prin transmitere maternă se produce o creştere a taliei premutaţiei la fiecare generaţie; amploarea fenomenului este variabilă şi impredictibilă. În cazuri rare (1%), este posibilă şi reversia de la o mutaţie completă la premutaţie, prin transmitere maternă.

c) Diagnostic şi tratament

Diagnosticul de sindrom X fragil se bazează pe testările genetice. Ele sunt indicate:

- la *băieţi* cu un retard important în achiziţia limbajului (vorbesc după vârsta de 4 ani), un RM inexplicabil, o simptomatologie de tip autist sau un istoric familial de RM (absenţa fenotipului evocator sau a istoricului familial de RM – nu permite în nici un caz excluderea diagnosticului);
- la *fete* cu un RM uşor în contextul unei anamneze familiale pozitive.

Pentru a creşte eficienţa testării genetice, în literatura de specialitate sunt propuse *scoruri de diagnostic* (specifice pentru adulţi şi copii), care iau în calcul toate elementele clinice menţionate mai sus.

Cariotipul efectuat în condiţii speciale (cu antifolaţi) ca şi testul imunohistochimic pe rădăcina firului de păr (cu anticorpi monoclonali faţă de proteina FMRP), folosit ca metodă *screening*, sunt considerate depăşite, deoarece nu identifică toate cazurile.

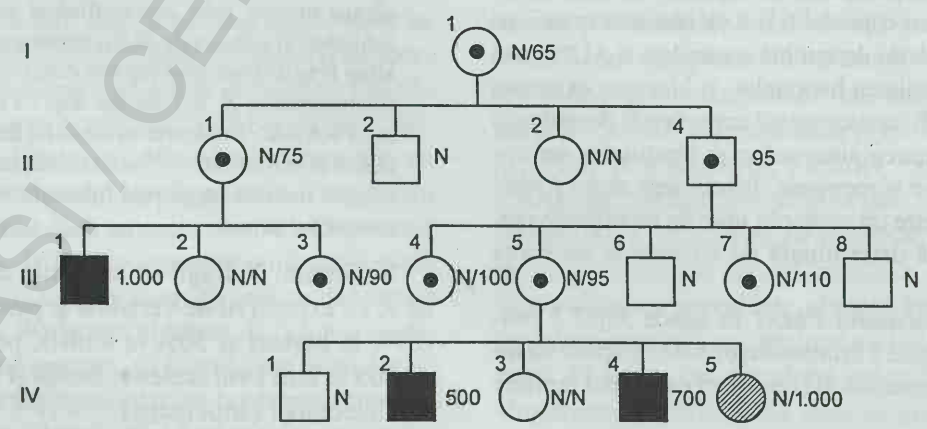


Figura 16.7. Transmiterea mutaţiilor în sindromul X fragil

Bolnavii cu RM sever sunt reprezentaţi prin simboluri colorate în negru, iar cei cu RM moderat, în gri-haşurat; persoanele ce au un punct în centrul simbolului sunt purtători. La dreapta simbolurilor este menţionată mărimea alelelor locusului *FRAXA* (N=6-50; 65 numărul de repetiţii). Transformarea premutaţiei în mutaţie depinde de mărimea premutaţiei la mamă (vezi I.1, II.1 şi III.5); toate fetele unui bărbat normal, dar transmiţător (II.4) vor fi purtătoare de premutaţie.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Diagnosticul sindromului X fragil se bazează pe evidențierea mutațiilor în gena FMR1. Procedura clasică de testare cuprinde două analize complementare: *Southern blot* pe ADN genomic (pentru a determina statusul metilării și dimensiunea mutațiilor complete) și *PCR* cu amorse ce flanchează repetiția (identifică premutațiile, mutațiile complete deseori nu se amplifică). Combinația celor două analize pentru detecția mutațiilor asociate sindromului X fragil are o sensibilitate de 99%. Restul de 1% dintre mutații includ mutații cu sens greșit sau deleții totale sau parțiale ale FMR1. De aceea, la orice individ care prezintă o suspiciune clinică de sindrom X fragil, dar are repetiții CGG în limitele normale trebuie efectuată CGH pe microrețele, pentru identificarea delețiilor, și/sau secvențierea genei FMR1. Protocoalele moderne de diagnostic înlocuiesc Southern blot (metodă radioactivă, ce necesită condiții speciale în laborator) cu *dichblotting* (metodă imunofluorescentă), sau pur și simplu utilizează *long range PCR* (care identifică și premutațiile și mutațiile complete) în locul asocierii PCR--Southern blot; această metodă PCR pare să aibă un raport preț/calitate mult mai bun.

După identificarea unui individ afectat în familie, este indicată *testarea în cascadă a rudelor*, care de multe ori duce la identificarea altor indivizi afectați/cu risc de a avea copii afectați.

Diagnosticul prenatal pentru mutații complete este indicat în familiile afectate în cazul sarcinilor femeilor afectate/purtătoare de premutație; poate fi efectuat pe celule fetale obținute prin amniocenteză sau biopsie de vilozități corionice și s-a dovedit a avea un înalt coeficient de siguranță.

4. Tratamentul sindromului X fragil

Tratamentul sindromului X fragil constă în intervenție psihofarmacologică asociată cu terapie ocupațională de integrare senzorială, tratament logopedic și educație specială. Cercetările recente pentru descoperirea unor ținte terapeutice sunt direcționate pe patogenia bolii și rolurile FMRP. S-a stabilit că proteina FMR funcționează prin fixarea pe diferite molecule de ARNm și că multe simptome sunt produse probabil prin activarea unui receptor de tip glutamat[7] (mGluR5); folosirea unor blocanți ai acestui receptor ar putea fi o soluție terapeutică.

C. Evaluarea diagnostică a retardului mental

Evaluarea copiilor cu întârziere în dezvoltarea psihomotorie sau RM este o acțiune *frecventă* în practica geneticii clinice și deosebit de *importantă* prin consecințele majore pe care le are asupra pacientului (invalid pe viață), asupra familiei sale (risc de recurență) și a societății (cheltuieli mari). Evaluarea RM este însă o acțiune *complexă* și *dificilă* (sute de entități diferite) care nu se poate rezolva corect decât de către *o echipă calificată* (genetician, neuropsihiatru, psiholog, neuroimagist etc.) care trebuie să dispună de posibilități de diagnostic imagistic, biochimic, cromozomial și molecular. *American College of Medical Genetics* a stabilit (1997) un ghid de evaluare a RM pentru geneticienii clinicieni. Potrivit acestui ghid, *obiectivele evaluării* unui pacient cu RMLX sunt:

- *stabilirea unui diagnostic specific, precis* sau suficient de *clar* privind cauzele și patogenia RM; factorii ce cresc eficiența evaluării diagnostice sunt: vârsta tânără la momentul evaluării inițiale; prezența unor anomalii congenitale; testarea ordonată secvențial; accesibilitatea la examinarea rudelor de gradele I și II; evaluările seriate în timp (fenotipul fizic și comportamentul se schimbă cu vârsta; apar noi tehnici; în genetica clinică diagnosticul este un *proces de acumulare*);
- *identificarea cauzelor*; aceasta va avea beneficii pentru bolnav (eliminarea testelor inutile și scumpe, stabilirea acțiunilor medicale și terapeutice adecvate, depistarea presimptomatică a complicațiilor, planning educațional și intervenție socială), dar și pentru familia bolnavului (prognostic ce va permite o ghidare anticipativă, sprijin medical, social și educativ, sfat genetic și opțiuni reproductive).

Diagnosticul și cauza RM pot fi identificate însă numai la 40-60% dintre pacienți. Este adevărat că lipsa unui diagnostic produce anxietate și incertitudine (pentru familie, medici, agenți sociali), dar un diagnostic incorect este și mai grav, ducând la stigmatizarea familiei și la un sfat genetic greșit. *Mai bine întârziem un diagnostic specific decât să facem unul incorect.*

Fără a intra în detalii vom preciza, schematic, care sunt etapele procesului de diagnostic al RMLX.

Evaluarea clinică (vezi și capitolul 10.A.5)

(1) *Istoric complet*: prenatal, perinatal (insistându-se asupra circumstanțelor de hipoxie) și postnatal (urmărindu-se evoluția parametrilor creșterii, dezvoltarea psihomotorie, convulsii, deficite auditive, vizuale).

7. Receptor cuplat cu proteina G pentru neurotrasnmițător de tip glutamate.

O atenție deosebită se va acorda mișcărilor fetale, unei suferințe fetale neexplicate în contextul materno-obstetrical, unei hipotonii neo- sau postnatale sau hipoactivității în primele luni după naștere.

(2) *Anamneză familială:* se vor obține date despre cel puțin trei generații, urmărindu-se prezența altor cazuri de RM, boli cronice, defecte congenitale etc. Se va evalua discret nivelul sociocultural al părinților.

În principiu, ar trebui examinat orice alt bolnav din familie, precum și frații și părinții săi; desigur, acest lucru este foarte dificil și atunci ar trebui obținute, prin colaborarea altor medici, informații/documente medicale, inclusiv fotografii atât recente, cât și de la diferite vârste (pentru a analiza morfologia feței, privirea, atitudinile etc.).

(3) *Examenul fizic* se va face după toate regulile clasice, având permanent în minte câteva principii:

- se vor evalua nu numai *pacientul, ci și rudele sale apropiate* (femei obligatoriu purtătoare; bărbați normali), pentru analiza gradului de asemănare;
- examenul va fi *complet și minuțios*, insistându-se asupra craniului (mărime, formă) și feței, asupra anomaliilor părului (textură), pielii (pigmentație), articulațiilor (laxitate), scheletului (curburi ale coloanei), organelor de simț;
- se vor cerceta cu atenție *semnele neurologice* (reflexe, masă și tonus muscular, mișcări involuntare, convulsii etc.) statice/dinamice, simetrice/asimetrice;
- se va studia și *fenotipul comportamental*;
- *elementele anormale* vor fi descrise atent, obiectivate prin măsurători, fotografiere, înregistrare audio (vorbire) și video (mișcări, comportament);
- *anomaliile minore* vor fi analizate cu atenție, stabilindu-se dacă sunt sau nu variante familiale (fenotipul pacientului se compară cu fenotipul bărbaților normali din familie).

(4) *Consult interclinic* (neurolog, oftalmolog, audiolog ș.a.). Un rol deosebit în evaluarea copilului cu RM îl are examenul neuropsihiatric, care va permite nu numai evaluarea gradului de RM sau al deficitelor cognitive, adaptative ori psihiatrice, ci și direcțiile de recuperare.

Teste de diagnostic

(1) *Teste genetice*

- *Analiza citogenetică* este importantă, deoarece anomaliile cromozomiale sunt cauza cea mai frecventă de RM; orice copil cu RM fără un diagnostic cert, inclusiv pacienții „nondismorfici", necesită un *cariotip cu marcaj de minimum 550 benzi.*
- Dacă suspiciunea clinică de anomalie cromozomială este importantă, se va recurge la *analize de „înaltă rezoluție"* (850 benzi) și eventual *FISH* țintit sau MLPA, pentru determinarea *microdelețiilor.*

În cazuri speciale, se va recurge la tehnici speciale: de exemplu, la pacienții cu asimetrie corporală, cu sau fără anomalii pigmentare, se va face un *cariotip din fibroblaști*, prin biopsie cutanată din regiunea respectivă; studiile pentru *disomia uniparentală* pentru cromozomii 7 și 14 se vor face la pacienți cu întârziere de dezvoltare psihică, retard de creștere, anomalii minore.

O atenție deosebită se acordă în ultimul timp *analizei subtelomerice* (regiuni bogate în gene), pentru depistarea unor defecte submicroscopice.

Datorită complexității și costului ridicat, se recomandă o preselecție clinică a cazurilor, pe baza următoarelor criterii:

- istoric familial de RM;
- tulburare de creștere cu debut prenatal;
- creștere postnatală deficitară sau exagerată;
- două sau mai multe dismorfii faciale;
- una sau mai multe dismorfii nonfaciale și/sau anomalii congenitale.

Investigarea rearanjărilor subtelomerice prin FISH sau MLPA se efectuează frecvent când cariotipul de înaltă rezoluție este normal, în special la pacienții cu fenotip anormal.

Folosirea combinată a cariotipului și analizei subtelomerice (prin FISH sau alte tehnici moleculare) permite detecția anomaliilor cromozomiale la 5-10% dintre pacienți.

- *Analiza moleculară pentru X fragil* (FRAXA). Diagnosticul molecular va fi făcut la toți pacienții (bărbați sau femei) cu RM inexplicabil (2,6% au test pozitiv), mai ales dacă prezintă elemente fenotipice evocatoare. Diagnosticul este important pentru pacient și familia sa, cu atât mai mult cu cât costul analizei este acceptabil, iar analiza cromozomială nu este sensibilă pentru diagnostic și nu evidențiază premutațiile. Unele „echipe" de diagnostic al RM preferă să înceapă evaluarea paraclinică a RM cu studiul molecular pentru FRAXA, iar dacă rezultatele sunt normale, să se treacă la analiza FRAXE și apoi la analizele cromozomiale. Cert este că în toate situațiile, ADN extras se va stoca pentru cercetări ulterioare, inclusiv pentru studiul mutațiilor.
- *Microrețele CGH* (cariotipare moleculară) este o metodă care a dublat rata detecției dezechilibrelor cromozomiale patogenice, prin creșterea nivelului de rezoluție de la 5 Mb (folosind cariotipul convențional) la 100 kb. Microrețelele CGH permite scanarea rapidă a întregului genom sau unor loci patologici cunoscuți într-un singur test, identificând cu o sensibilitate înaltă delețiile și/sau duplicațiile, dar nu poate detecta rearanjările echilibrate (translocații reciproce, inversii) – care apar la aproximativ 0,75% dintre pacienții cu RM. În plus,

CGH poate detecta numeroase arii de ADN mai lungi de 1kb cu număr variabil de copii comparativ cu genomul normal de referință numite CNV (*Copy Number Variations*), care pot fi sau nu asociate cu un fenotip patologic. Această tehnică nouă poate evidenția anomalii cromozomiale submicroscopice la pacienții cu RM și analize citogenetice normale, având rate de detecție de 5-20%. Deși în prezent este utilizată ca un test auxiliar la cariotipul standard, este probabil că va deveni testul genetic de elecție, în special în cazurile de RM/ACM idiopatic.

- *Noile tehnici de secvențiere a AND* (vezi capitolul 5) par să fie foarte promițătoare pentru diagnosticul pacienților cu RM, atât a formelor legate de X, cât și a celor autozomale.

(2) *Neuroimagistica.* Evaluarea imagistică a SNC (CT, RMN) depistează anomaliile structurale ale creierului. Decizia de a face aceste examene trebuie luată după alte evaluări ale pacientului, și nu înaintea acestora. Va fi indicată la pacienții cu micro-/macrocefalie, cu anomalii de contur cranian, semne neurologice, convulsii, pierdere a achizițiilor. CT este util în craniostenoze și calcificări intracraniene, dar RMN – în ciuda costului și necesității de a anestezia bolnavul – este metoda de elecție în cele mai multe cazuri.

(3) Screening-*ul metabolic.* În RM, erorile de metabolism au un rol bine definit, dar prevalența lor este mică. Testarea metabolică va fi țintită, în funcție de istoricul pozitiv și semnele clinice evocatoare (tulburare de creștere, convulsii, ataxie, hipotonie, aspect facial „grosier", anomalii oculare, surditate, anomalii cutanate și în structura părului, anomalii osoase, hepato-splenomegalie ș.a.).

Conferința de consens a *American College of Medical Genetics* (1995) a stabilit însă *că nici un protocol nu va înlocui judecata clinică a practicianului*; noi vom sublinia din nou că diagnosticul corect este un proces de acumulare în timp a ceea poate fi realizat de o echipă antrenată în acest domeniu, beneficiind de dotările necesare de explorare (vezi figura 16.8 și caseta 16.2). În plus, buna comunicare cu părinții sau cu cei care îngrijesc copilul este deosebit de importantă, în cele mai multe cazuri, pentru o colaborare eficace în acțiunile ulterioare de diagnostic, îngrijire și recuperare.

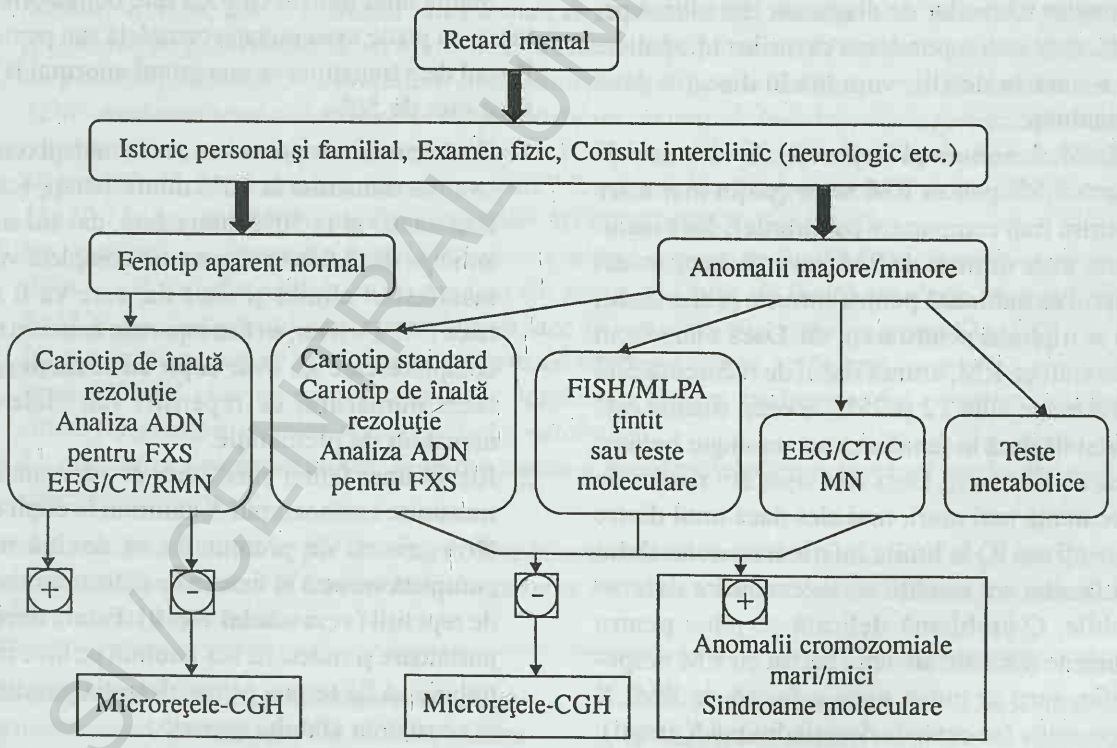


Figura 16.8. Algoritm de diagnostic propus pentru cazurile de RM de etiologie necunoscută
(modificat după Galasso *et al.*, 2010)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

D. Sfatul genetic în retardul mental

Sfatul genetic în RM depinde de diagnostic şi, fireşte, de datele familiale. Dacă s-a stabilit un *diagnostic specific*, atunci riscul de recurenţă se va evalua pe baza etiologiei cromozomiale sau monogenice, folosind datele prezentate deja în capitolul 10.C. Dacă *nu s-a pus un diagnostic specific*, dar pacientul are RM asociat cu o anomalie de tipul microcefalie, hidrocefalie, epilepsie, spasticitate sau cu o dismorfie facială necaracteristică, atunci riscul empiric de recurenţă este de 3-4%. Într-un studiu recent dedicat acestei probleme, Crow şi Tolmie (1998) analizează două situaţii.

- *RM nespecific.* Pacienţii au perimetrul cranian normal, nu prezintă semne dismorfice caracteristice unui sindrom cunoscut (pot avea însă câteva dismorfii minore) şi nu au semne neurologice. În aceste cazuri, riscurile se calculează pe baza datelor studiului efectuat în British Columbia (Herbst, Baird, 1982), deşi acesta a fost realizat înaintea progreselor tehnicilor de diagnostic din ultima perioadă, care reduc ponderea cazurilor idiopatice. Fără a intra în detalii, vom lua în discuţie două eventualităţi:
  - *Riscul de recurenţă în fratrie.* Acesta este de circa 5,5% pentru RM *sever* (puţin mai mare pentru fraţi comparativ cu surorile); dacă includem toate formele de RM (sever şi uşor), atunci riscul se dublează pentru surorile probandului şi se triplează pentru fraţii săi. Dacă s-au născut doi fraţi cu RM, atunci riscul de recurenţă este mai mare, între 12 şi 25%; aceeaşi situaţie este valabilă dacă în familie există un singur bolnav, dar cu RM uşor. Deci RM uşor are riscuri de recurenţă mai mari, mai ales dacă unul dintre părinţi are IQ la limita inferioară a normalului şi familia are condiţii socioeconomice defavorabile. O problemă delicată se pune pentru surorile normale ale unui bărbat cu RM nespecific, care ar putea avea o formă de RMLX nespecific (se exclude deci sindromul X fragil); s-a calculat că în această ipoteză riscul surorii de a fi purtătoare este de 1/40.
  - *Riscul de recurenţă la descendenţii unui adult cu RM uşor* (cu un partener normal). Acesta este de circa 8%; totuşi, pentru femeile cu RM uşor, riscul unor urmaşi cu RM este ceva mai mare, de circa 14%.
- *RM asociat cu semne neurologice neprogresive.* La aceşti bolnavi, cauza cea mai probabilă o reprezintă factorii de mediu care au acţionat în ultima perioadă a sarcinii sau perinatal, chiar dacă anamneza nu evidenţiază prezenţa lor. În aceste cazuri, riscul de recurenţă este foarte mic, 0,5%. Dar un procent de 1-2% dintre aceşti copii pot avea o boală genetică autozomal recesivă, iar acest fapt trebuie să ne determine să cercetăm cu atenţie un diagnostic specific.

Sfatul genetic în sindromul X fragil depinde de precizia diagnosticului molecular care stabileşte că bolnavul are X fragil, identifică purtătorii de premutaţie şi determină dimensiunile expansiunii. În familia unui bolnav cu X fragil, indivizii identificaţi ca nepurtători au un risc zero. Pentru purtători, riscul de a avea copii cu X fragil depinde de sexul părintelui purtător, de sexul copilului şi de mărimea repetiţiei. Purtătorii de premutaţie vor fi consiliaţi privind riscul de a transmite o mutaţie completă la copii şi propriul risc de a dezvolta insuficienţă ovariană precoce/FXTAS.

Mama unui individ cu FXS este obligatoriu purtătoare; ea poate avea mutaţie completă sau premutaţie. Riscul de a transmite cromozomul anormal la băieţi/fiice este de 50%.

1. Dacă femeia este purtătoare a unei mutaţii complete, ea o va transmite la 50% dintre băieţi, (care vor fi afectaţi) şi la 50% dintre fete, dar nu se poate anticipa dacă fiicele cu mutaţie completă vor avea manifestări clinice şi dacă da, care va fi severitatea RM. Deşi rar, au fost raportate femei cu mutaţii complete care au avut copii cu reversii (micşorarea numărului de repetiţii) sau alele cu dimensiuni de premutaţie.
2. Riscul unei femei purtătoare de premutaţie de a transmite cromozomul X anormal la copii este de 50% ; riscul ca premutaţia să devină mutaţie completă variază în funcţie de mărimea numărului de repetiţii (vezi tabelul 16.10). Fetele unei femei purtătoare şi rudele de sex feminin pe linie maternă trebuie să fie testate pentru detecţia purtătoarelor şi acordarea sfatului genetic.

Tabel 16.10. Riscul unei femei purtătoare de premutaţie

Mărimea premutaţiei la mamă	Risc de transformare în mutaţie completă la copil
55-59 CGG	5,4%
60-80 CGG	19-50%
80-100 CGG	73-87%
>100 CGG	~100%

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 16.2

Algoritm modern de diagnostic al retardului mental

În 2003, doi reputați specialiști – Battaglia și Carey – au propus un algoritm de evaluare a unui pacient cu întârziere de dezvoltare/retard mental, bazat pe clinică și cele mai recente teste de diagnostic citogenetic și molecular și/sau tehnici imagistice. Chiar dacă această metodologie de „evaluare rațională" (cum susțin autorii), pentru alegerea celor mai potrivite teste, este inaccesibilă multor servicii, considerăm utilă cunoașterea ei.

Pe baza anamnezei, examenului fizic și neurologic – pacientul este inclus în una din două categorii: (A) fenotip aparent normal; (B) semne, simptome ce pledează pentru un fenotip anormal.

În prima situație (A) – corespunzătoare RM nesindromic – se va face (1) cariotip de înaltă rezoluție (pentru microdelețiii) + (2) analiza ADN pentru X fragil (dacă pacientul nu are microcefalie). În situația unor rezultate normale se va efectua (3) analiza subtelomerică. Pasul următor se va face dacă rezultatul (3) este normal și va consta din (4) RMN și (5) cercetarea unor mutații și delețiii în gena MECP2 (implicată în sindromul Rett, dar care poate da și alte forme de RM); în cazul unor rezultate normale se va concluziona „RM idiopatic".

În a doua situație (B) – care sugerează un RM sindromic – testele ce se vor efectua depind de manifestările clinice.

(1) La pacienții cu manifestări de autism, dar fără alte dismorfii sau doar 1-2 anomalii minore și/sau epilepsie se va efectua (a) cariotipul standard și (b) analiza citogenetică și moleculară a regiunii 15q11-13.

(2) La pacienții cu hipotonie și fenotip asemănător sindromului Prader-Willi se vor face (a) studii de metilare a ADN; dacă rezultatul este normal, se va trece la (b) analiza ADN pentru X fragil; dacă și aceasta va fi normală, se va efectua (c) analiza ADN pentru UPD14 și mutații în MECP2.

(3) La pacienții cu fenotip asemănător sindromului Angelman se va începe (a) cu analiza metilării ADN; dacă rezultatul este normal se va efectua (b) un cariotip de înaltă rezoluție (pentru microdelețiii); pașii următori sunt: (c) analiza subtelomerică 22q13.3; (d) CGH pentru anomalii în 2q21-23 sau 4q sau 17q23.2; (e) analiza mutațiilor MECP2; (f) analiza citogenetică și moleculară a regiunii 15q11-13; (g) analiza mutațiilor în genele: MTHFR, ATR-X, SMADIP1.

(4) La pacienții cu dismorfie facială ± microcefalie ± semne de boală Hirschprung/constipație ± defecte ale liniei mediane, se va cerceta (a) pe un cariotip de înaltă rezoluție prezența deleției 2q22 și dacă rezultatul este normal se va face (b) analiza mutațiilor în gena SMADIP1.

(5) La pacienții cu semne neurologice progresive/neprogresive se va începe cu analiza mutațiilor în gena MECP2 și se va continua cu teste biochimice pentru evaluarea: (a) creatinei; (b) transferinei; (c) glicoproteinelor serice; (d) alți metaboliți.

(6) La pacienții cu elemente clinice sugestive pentru o boală metabolică se vor face analizele biochimice corespunzătoare.

Autorii precizează că un astfel de protocol nu înlocuiește libertatea clinicianului de a face testele pe care el consideră potrivit să le recomande, dar permite evitarea unor analize sofisticate și scumpe, atunci cînd ele sunt mai puțin indicate.

3. Toate fetele unui bărbat cu premutație sunt obligatoriu purtătoare de premutație, dar nici unul dintre băieți nu va moșteni mutația.
4. Bărbații cu mutație completă sau mozaic nu vor transmite mutația la băieți și cel mai probabil vor transmite o premutație la fete. Deși inițial s-a crezut că bărbații cu mutații complete au doar premutații în spermatozoizi, există cazuri raportate de bărbați cu mutație completă/mozaic care au avut fiice cu mutație completă.

BCU "VICTOR BABEȘ" UNIVERSITY LIBRARY

Bibliografie specifică selectivă

1. *** American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV).* American Psychiatric Association, Washington DC, 39-46.
2. Arena JF, Kubs HA. *Computerized Approach to X-linked mental retardations syndromes.* Am J Med Genet 1991; 38:190-199.
3. Battaglia A, Carey JC. *Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation.* Am J Med Genet 2003; 117C:3-14.
4. Bayley N. *Bayley Scales of Infant Development.* ed. a III-a (BSID-III). Psychological Corporation, San Antonio, 2005.
5. Chelly J, Khelfaoui M, Francis F *et al. Genetics and pathophysiology of mental retardation.* Europ J Hum Genetics 2006; 14:701-713.
6. Chiurazzi P, Schwartz CE, Gecz J *et al. XLMR genes: update 2007.* Europ J Hum Genetics 2008; 16:422-434.
7. Coffey SM, Cook K, Tartaglia *et al. Expanded clinical phenotype of women with the FMRl premutation.* Am J Med Genet 2008; A146:1009-1016.
8. Crow YJ, Tolmie JL. *Recurrence risks in mental retardation.* J Med Genet 1998; 35:177-182.
9. Curry CJ *et al. Evaluation of Mental Retardation: recommendations of a consensus conference.* Am J Med Gen 1997; 72:468-477.
10. De Vries BBA, White SM, Knight SJL *et al. Clinical study on submicroscopic subtelocentric rearrangements.* J Med Genet 2001; 38:145-150.
11. D'Hulst C, Kooy RF. *Fragile X syndrome: from molecular genetics to therapy.* J Med Genet 2009; 46:577-584.
12. Dölen G, Carpenter RL, Ocain TD, Bear MF. *Mechanism-based approaches to treating fragile X.* Pharmacol Ther 2010; 127(1):78-93.
13. Flint J, Knight S. *The use of telomere to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation.* Curr Opin Genet Dev 2003; 13:310-316.
14. Galasso C, Lo-Castro A, El-Malhany N *et al. „Idiopathic" mental retardation and new chromosomal abnormalities.* Italian Journal of Pediatrics 2010; 36:17-27.
15. Garber K, Visootsak J, Warren S. *Fragile X syndrome.* Europ J Hum Genetics 2008; 16:666-672.
16. Gécz J, Shoubridge C, Corbett M. *The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X.* Trends in Genetics 2009; 25(7):308-316.
17. Giangreco CA, Steele MW, Aston CE *et al. A simplified six-item check list for screening for fragile X in the paediatric population.* J Pediatr 1996; 129:611-614.
18. Grant ME. *The epigenetic origins of mental retardation.* Clin Genet 2008; 73:528-534.
19. Knight SJL. *Genetics of Mental Retardation. An Overview Encompassing Learning Disability and Intellectual Disability.* Karger, Berna, 2010.
20. Leonard H, Wen X. *The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium.* Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2002; 8:117-134.
21. McConkie-Rose A, Abrams L, Finucane B, Cronister A, Cane LW, Coffey SM, Sherman S, Nelson LM, Berry-Kravis E, Hessl D, Chiu S, Street N, Vatave A, Hagerman RJ. *Recommendations from multi-disciplinary focus groups on cascade testing and genetic counseling for fragile X-associated disorders.* J Genet Couns 2007; 16:593-606.
22. Penagarikano O, Mulle JG, Warren ST. *The Pathophysiology of Fragile X Syndrome.* Annu Rev Genomics Hum Genet 2007; 8:109-129.
23. Ramakers GJA. *Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition.* Trends Neurosci 2002; 25:191-199.
24. Raymond FL, Tarpey P. *The genetics of mental retardation.* Human Molecular Genetics 2006; 15(2):R110-116.
25. Ropers HH. *Genetics of intellectual disability.* Curr Opin Genetics & Development 2008; 18:241-250.
26. Stevenson R, Schwartz CE, Schorer RJ. *X-linked Mental Retardation.* Oxford University Press, New York, Oxford, 2000.
27. Shaffer LG. *American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation.* Genet Med 2005; 7:650-654.
28. Sutherland GR, Mulley JC. *Fragile X syndrome an other causes of X-linked mental handicap.* În Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics.* ed. a III-a. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1997, 1745-1746.
29. Stevenson RE, Procopio-Allen AM, Schroer RJ *et al. Genetic syndromes among individuals with mental retardation.* Am J Med Genet A 2003; 123:29-32.
30. Tassone F, Pan R, Amiri K, Taylor AK, Hagerman PJ. *A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (FMRI) gene in newborn and high-risk populations.* J Mol Diagn 2008; 10:43-49.
31. World Health Organization. *International Statistical Classification of Diseases and Health Related Problems.* ICD 10. Geneva, 2001.
32. Xu J, Chen Z. *Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation.* Am J Med Genet 2003; 117C:15-24.

BCU / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 17

GENETICA SISTEMULUI IMUN

A. Generalități despre sistemul imun

Rolul **sistemul imun**, despre care s-a crezut că ar fi doar acela de a apăra organismul împotriva agenților patogeni, este de fapt mult mai complex, bazându-se pe capacitatea de a face distincție între *self* (propriu organismului) și *non-self* (străin).

Sistemul imun prezintă două componente, complet diferite din punct de vedere al percepției antigenelor (structuri *non-self*): sistemul imun nespecific (înnăscut) și cel specific (adaptativ).

- **Imunitatea înnăscută** se referă la toate elementele pe care organismul le posedă încă de la naștere și care reprezintă *prima linie de apărare* împotriva antigenelor. Aceste elemente includ componente externe și interne începând de la piele (și secrețiile acide ale glandelor sudoripare și sebacee), mucoase (și mucusul care le acoperă), reflexul de tuse și strănut, secreția lacrimală, mișcarea cililor, creșterea temperaturii corporale, oxigenarea de la nivelul plămânilor, lizinele eliberate de către microorganismele comensale și până la componentele sistemului complement, fagocitele sau celulele NK („*natural killer*" – celule care răspund la unele infecții virale sau prezența celulelor tumorale). Nici una dintre acestea nu ține cont de tipul antigenului (de specificitatea sa) și intră în acțiune *rapid,* într-un timp remarcabil de scurt.
- **Imunitatea adaptativă** (specifică, dobândită[1]) reprezintă apanajul exclusiv al vertebratelor și se bazează pe existența limfocitelor. Răspunsul acestor celule este mai *lent* și este *dobândit* doar prin contactul cu antigenul; în plus, răspunsul este caracteristic, *specific* doar acelui antigen. Acest lucru este posibil datorită unui fenomen extraordinar care înzestrează limfocitele cu receptori pentru antigene.

Sistemul imun ar putea fi descris prin prisma funcțiilor sale: *supraveghere* (distincția *self/non-self*), *apărare* (declanșarea unui răspuns, natural sau dobândit, în scopul eliminării sau neutralizării antigenului), *reglare* (controlul răspunsurilor imune prin mecanisme reglatorii în scopul menținerii homeostaziei sau prevenirii distrugerilor tisulare), *memorie imunologică* (capacitatea de a răspunde optimizat la un nou contact cu același antigen) și *toleranță* (inducerea unei stări de neresponsivitate față de anumite antigene). Odată declanșat un răspuns față de un antigen (răspuns imun), vor fi implicate atât imunitatea specifică, cât și cea nespecifică, într-un sistem integrat.

Limfocitele derivă din celulele stem limfoide. În funcție de locul unde se vor maturiza în continuare (timus sau măduvă osoasă) vor rezulta limfocite T, respectiv limfocite B. Înainte de a părăsi timusul, limfocitele T suferă o diferențiere suplimentară în limfocite T helper și limfocite T citotoxice. Chiar dacă maniera lor de acțiune, precum și consecințele sunt foarte diferite, activarea limfocitelor T va conduce la un răspuns imun denumit „*celular*". Activarea limfocitelor B va conduce la diferențierea lor în *plasmocite*; aceste celule secretă anticorpi, molecule capabile să recunoască antigenele (noțiunea de anticorp va fi discutată ulterior). Acest tip de răspuns imun este denumit „*umoral*". Deși fiecare tip de răspuns prezintă caracteristici distincte, între ele există o strânsă interdependență (figura 17.1).

Practic, noțiunea de **receptor** implică automat noțiunea de *specificitate*: legarea dintre receptor și ligandul său nu poate fi decât una specifică. Ideea unei astfel de interacțiuni a apărut încă din 1897, odată cu studiile lui Paul Ehrlich cu privire la legarea dintre toxina difterică și antitoxina difterică. Paul Ehrlich este cel care avansează „*teoria catenelor laterale*" în care se postulează genial nu numai existența receptorilor (catene laterale) pentru antigen, dar și caracterul

1. Acest termen istoric, poate induce o serie de confuzii. Multe dintre componentele sistemului imun dobândit sunt, de asemenea, prezente de la naștere.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

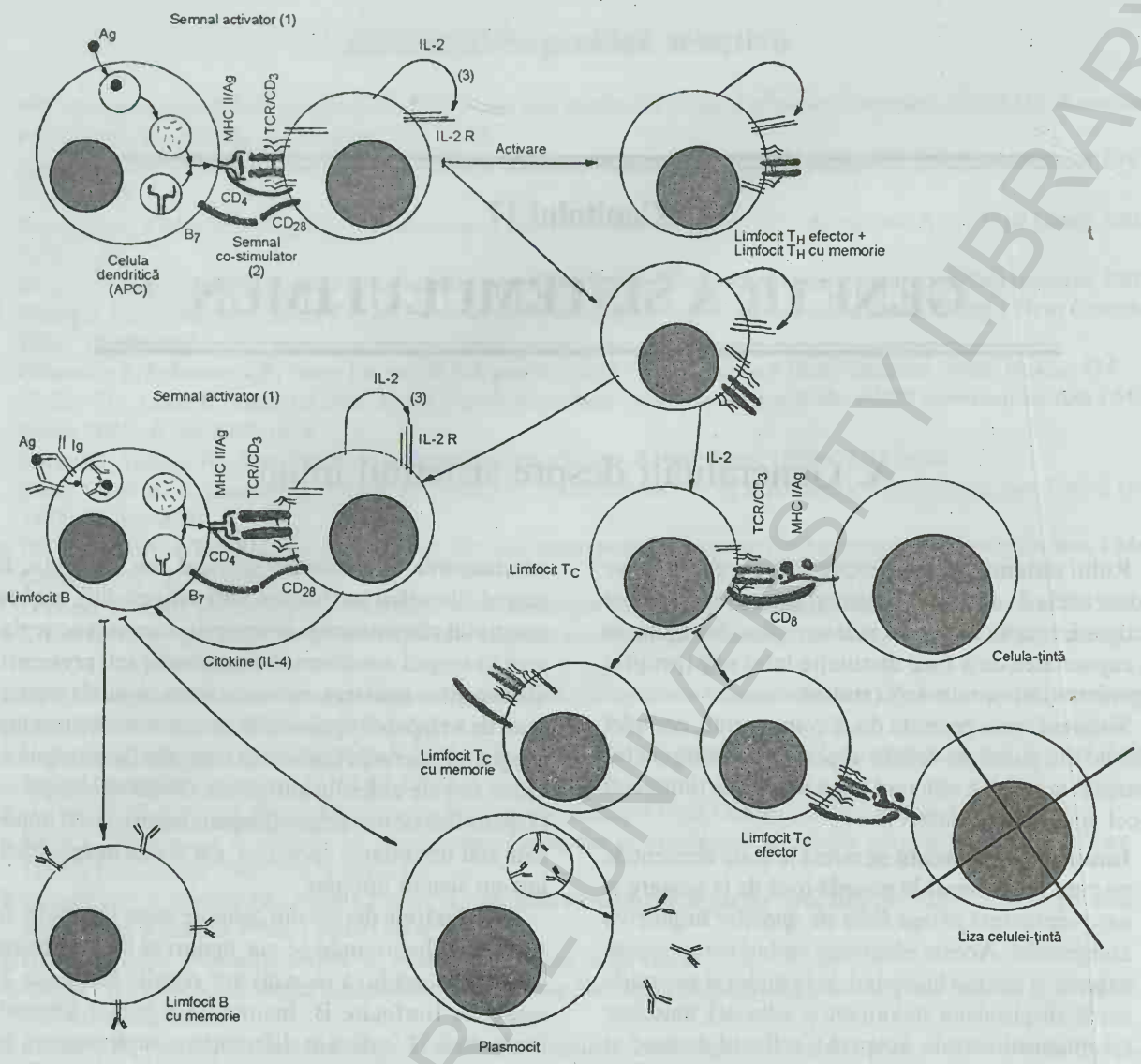


Figura 17.1. Interacțiuni celulare în cadrul unui răspuns imun

(modificat după Goldsby, Kindt și Osborne, 2000)

În răspunsul imun umoral, limfocitele B interacționează cu antigenele libere, se diferențiază în plasmocite, care secretă anticorpi. Anticorpii se leagă la antigene, contribuind la eliminarea acestora. În răspunsul imun celular, limfocitele T (helper și citotoxice) recunosc antigenul procesat și prezentat pe anumite celule și răspund prin producerea de factori solubili sau prin liza celulei-țintă.

preformat (receptori produși încă de dinaintea pătrunderii antigenului în organism).

Specificitatea implică faptul că fiecare receptor își leagă ligandul său, sau altfel spus, un receptor nu poate fi utilizat decât de un singur ligand. Numărul extrem de mare de structuri care se pot constitui în antigene implică faptul că în interiorul organismului ar trebui să existe un număr corespunzător de receptori pentru aceste antigene. Astfel, numărul de antigene existente în natură (cifra teoretică avansată se ridică la minimum 10^9) și deci al receptorilor pentru antigen care trebuie să existe în mod corespunzător, depășește numărul total al genelor existente în genom. Această constatare se află în totală contradicție cu dogma geneticii care postula: „*o genă – o proteină*".

Contestată tocmai pentru ideea de receptori pre-formați, teoria lui Ehrlich a revenit în atenție datorită probelor experimentale de netăgăduit. Mai întâi, Niels Jerne demonstrează existența anticorpilor naturali, cu care organismul se naște (deci pre-formați), iar apoi Burnet, Talmage și Lederer contribuie la conturarea „*Teoriei selecției clonale*", teorie pe care se bazează întreaga imunologie modernă. Dar dacă receptorii sunt într-adevăr pre-formați, înseamnă că *organismul dispune de capacitatea de a produce receptori pentru toate antigenele existente*, inclusiv pentru cele cu care organismul s-ar putea să nu se întâlnească niciodată. Devenea astfel tot mai evident faptul că mecanismul genetic de formare al *receptorilor pentru antigene* este unul cu totul special și că organismul a elaborat o strategie particulară pentru formarea lor, astfel încât să se poată ajunge la această enormă diversitate, necesară pentru a face față întregii game de antigene.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

B. Mecanismele genetice care stau la baza generării diversității imunoglobulinelor

Imunoglobulinele reprezintă componentul central al receptorului pentru antigen al limfocitului B (BCR – *B cell receptor*), căruia i se alătură moleculele constante Igα și Igβ, cu rol în transmiterea intracelulară a semnalului interceptat de receptor (figura 17.2).

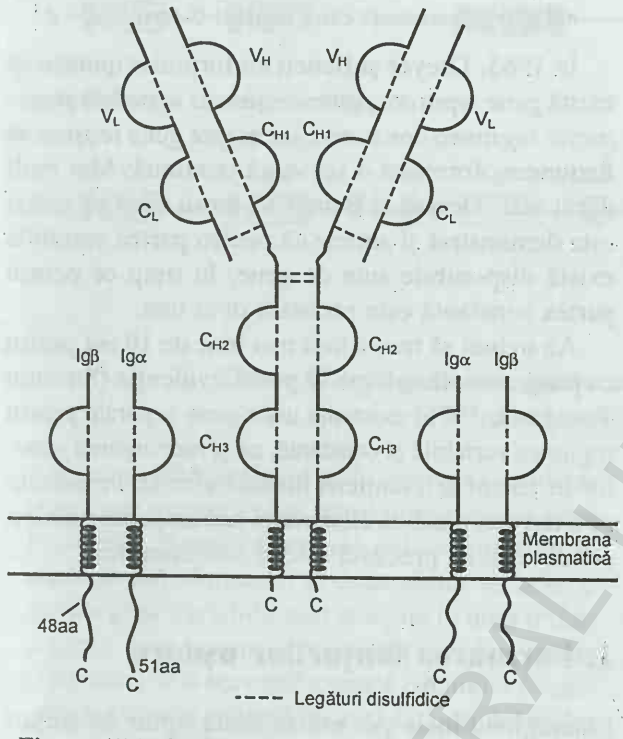


Figura 17.2. Structura receptorului pentru antigen al limfocitului B (BCR – B Cell Receptor)

(modificat după Goldsby, Kindt și Osborne, 2000)

Componentul dedicat legării antigenului (imunoglobulina) este format din două lanțuri grele identice și două lanțuri ușoare identice, unite prin legături di-sulfidice inter-lanț și legături fizice între domeniile extracelulare. Moleculele Igα și Igβ sunt constante și au rol în transmiterea intracelulară a semnalului.

Studiile enzimatice efectuate în anii '60 au condus la elucidarea structurii sale, formată din două lanțuri grele (H) identice și două lanțuri ușoare identice (L). Încă de pe atunci devenise evident că cele două capete ale acestei glicoproteine posedă funcții diferite. Recunoașterea antigenului este efectuată cu ajutorul capătului amino-terminal, în timp ce capătul carboxi-terminal este implicat în ceea ce denumim funcții „biologice". Lanțurile au fost împărțite ca atare într-o *porțiune variabilă* (N-terminală) și o *porțiune constantă* (C-terminală). Fiecare moleculă de imunoglobulină posedă două situsuri identice de legare a antigenului, iar la formarea fiecăruia participă atât partea variabilă a lanțului L, cât și partea variabilă a lanțului H. Astăzi știm că porțiunea din imunoglobulină dedicată legării antigenului, numită **paratop**, este extrem de redusă ca dimensiuni, fiind alcătuită din doar câțiva aminoacizi, localizați în așa numitele *regiuni hipervariabile*. Nici antigenul nu participă la legare în întregul său, ci cu o porțiune corespunzătoare din punct de vedere dimensional, numită **epitop**.

Adâncirea studiilor de structură a relevat organizarea moleculei în domenii globulare, formate din câte două straturi opuse, unite prin intermediul unei legături disulfidice intra-lanț și a unei legături hidrofobe (figura 17.3). Fiecare dintre straturi este format dintr-un număr de foi β pliate, antiparalele, unite prin bucle de conexiune. Totodată, analiza comparativă a unui număr mare de lanțuri a evidențiat că diferențele dintre acestea nu se regăsesc dispuse aleatoriu în structura primară a proteinei, ci sunt restrânse la nivelul câtorva porțiuni înguste, numite regiuni hipervariabile. La nivelul domeniului globular, regiunile hipervariabile se regăsesc în regiunea buclelor de conexiune dintre foile β pliate[2].

În organism este descris un număr mare de molecule care conțin una sau mai multe regiuni homologe cu domeniile globulare ale imunoglobulinelor. Împreună ele alcătuiesc „*superfamilia imunoglobulinelor*". Cu siguranță că această formă de organizare a peptidelor reprezintă o manieră de evoluție către o structură mai stabilă, mai avantajoasă pentru organism. Prezența domeniilor globulare în atât de multe molecule diferite sugerează că genele care le codifică s-au format, cel mai probabil, dintr-o genă ancestrală comună, care a fost ulterior multiplicată (și modificată în același timp), iar apoi distribuită în genom.

Fiecare limfocit B posedă pe suprafața sa imunoglobuline cu o specificitate unică, astfel că fiecare limfocit B este capabil să răspundă unui epitop unic. Acest aspect a fost înțeles și acceptat odată cu *teoria selecției clonale*. Antigenele pătrunse în organism vor *selecta* acele clone de limfocite care au specificitățile potrivite, le vor *activa* și vor *induce proliferarea*

2. Existența regiunilor hipervariabile a fost pusă în evidență de către Wu și Kabat în diagramele care le poartă numele. Analiza regiunilor variabile a relevat că, din punct de vedere al structurii primare, diferențele dintre lanțuri se regăsesc la nivelul unor porțiuni înguste, denumite CDR (*complementarity determining region*), în timp ce, în afara acestora (regiuni cadru), diferențele dintre lanțuri nu sunt nici pe departe la fel de marcate.

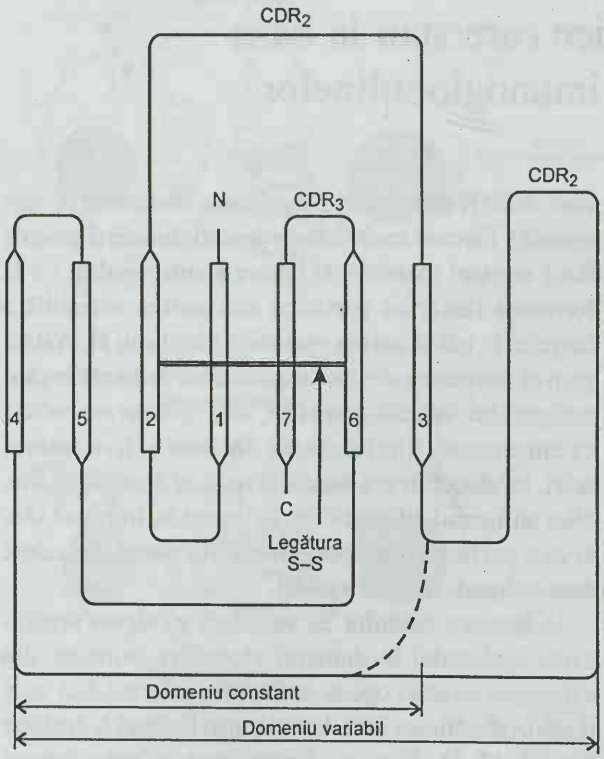


Figura 17.3. Structura domeniilor globulare
(modificat după Roitt, 1998)

Domeniile globulare sunt formate din câte două straturi opuse, unite prin legături S-S intra-lanț și legătura hidrofobă. Fiecare strat este format dintr-un număr variabil de foi β pliate. Se remarcă faptul că domeniile variabile sunt mai mari, iar buclele de conexiune dintre foile β pliate sunt mai lungi (aici se găsesc aminoacizii implicați efectiv în formarea situsului de legare al receptorului). CDR – regiuni hipervariabile

lor. O parte din aceste limfocite se vor diferenția în **plasmocite**, celule care nu mai exprimă imunoglobuline pe suprafață deoarece sintetizează lanțuri grele mai scurte și sunt astfel incapabile de a mai insera aceste molecule în membrană. În schimb, plasmocitele vor secreta imunoglobulinele, iar această variantă solubilă a receptorului pentru antigen al limfocitului B capătă numele de **anticorp**. Anticorpii sunt și ei capabili să recunoască antigenele în mod specific și să se cupleze cu acestea formând complexe antigen-anticorp (**complexe imune**).

Se estimează că sistemul imun al mamiferelor este capabil să sintetizeze mai mult de 10^{10} *imunoglobuline (anticorpi) diferiți*[3], un număr imens de molecule, care depășește cu mult numărul de gene pe care genomul uman îl poate pune la dispoziție.

Se pune firesc întrebarea: cum este posibilă sinteza numărului imens de imunoglobuline. O primă teorie (*germ-line theory* – teoria liniei germinale) estima că doar aproximativ 15% dintre genele unui genom haploid sunt alocate codificării imunoglobulinelor, fără să poată oferi însă nici o explicație pentru modalitatea formării, cu un număr limitat de gene, a unui număr atât de mare de structuri diferite. Alte teorii ulterioare (*somatic variation theories* – teoriile variației somatice) susțineau că, într-adevăr, din totalul genelor din genom, doar un număr limitat erau alocate sintezei imunoglobulinelor, dar că, prin *recombinări și mutații*, acestea erau capabile să ducă la diversitate. Din păcate însă, nici aceste teorii nu au reușit să răspundă la întrebarea ridicată de studiile structurale, care au evidențiat că moleculele de anticorpi manifestă nu numai diversitate la capătul N-terminal, dar și constanță către capătul C-terminal.

În 1965, Dreyer și Benett au formulat ipoteza că există *gene separate pentru regiunea variabilă și respectiv regiunea constantă*, iar aceste gene reușesc să fuzioneze, formând o secvență continuă. Mai mult decât atât, Dreyer și Benett au intuit ceea ce astăzi este demonstrat și anume că pentru partea variabilă există disponibile sute de gene, în timp ce pentru partea constantă este necesară doar una.

Au trebuit să treacă însă mai bine de 10 ani pentru ca progresul tehnologic să poată evidenția (Susumu Tonegawa, 1976) existența unor gene separate pentru regiunea variabilă și constantă, ca și *rearanjarea genelor* în cursul diferențierii limfocitelor B. Pe măsură ce a devenit posibilă clonarea și secvențierea genelor, s-a dovedit că procesul este și mai complex.

1. Formarea lanțurilor ușoare

Imunoglobulinele pot utiliza două tipuri de lanțuri L, denumite kappa (k) și, respectiv, lambda (λ), în funcție de partea constantă. Partea constantă și partea variabilă a lanțurilor ușoare sunt aproximativ egale din punct de vedere al dimensiunii. O moleculă de imunoglobulină poate folosi fie lanțuri k, fie lanțuri λ (dar nu ambele simultan), fără ca aceasta să afecteze în vreun fel funcționalitatea receptorului sau a anticorpului.

Fiecare dintre cele două lanțuri ușoare este codificat de gene distincte, situate pe cromozomi diferiți: setul de gene care codifică lanțul k este situat pe cromosomul 2 (figura 17.4), iar genele lanțului ușor λ sunt localizate pe cromozomul 22.

Prima opțiune a limfocitului B este reprezentată întotdeauna de *lanțul ușor k*. Partea variabilă a lanțului k (începând de la capătul N-terminal) are o lungime de 108 aminoacizi și este codificată de două gene distincte: *gena V* (variabilă) codifică primii 95 de aminoacizi și *gena J* (*joining* – unire) codifică aminoacizii 96-108.

3. Totalitatea specificităților diferite pe care le poate produce sistemul imun este cunoscută sub numele de *repertoriu imunologic*.

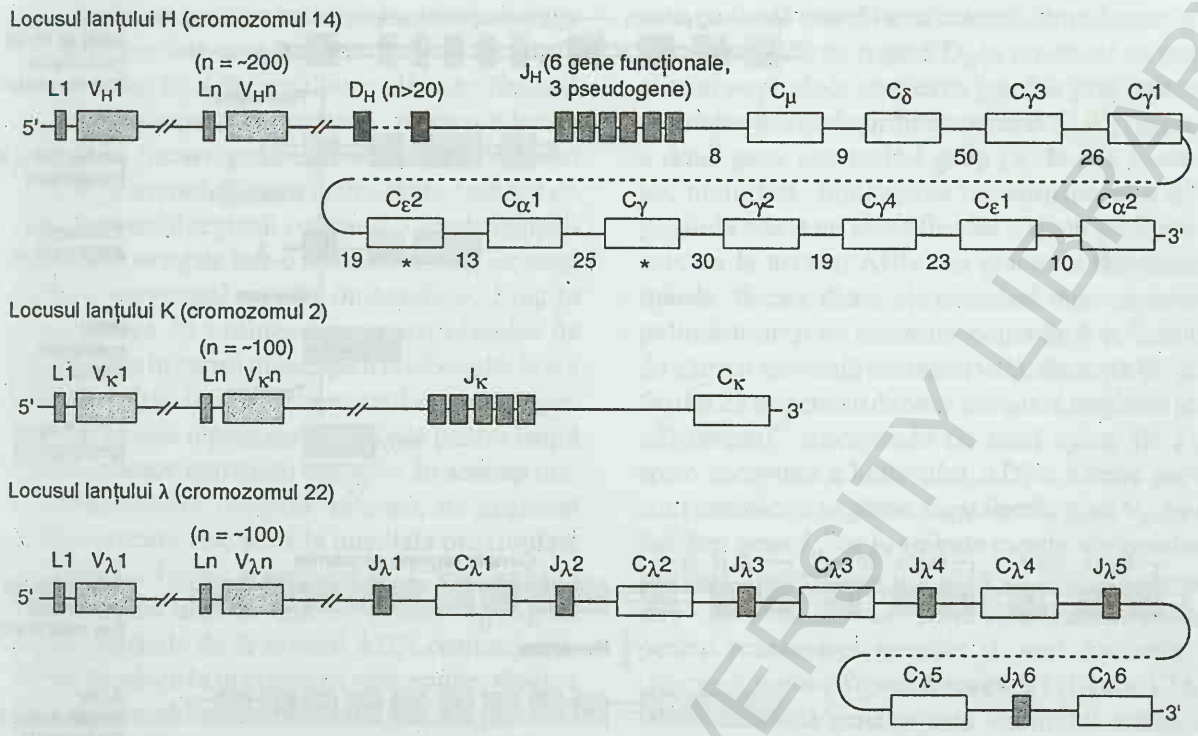


Figura 17.4. Organizarea genelor imunoglobulinelor în linia germinală
(după Nussbaum *et al.*, 2001)

- Analiza genică a relevat că în genomul celulelor germinale umane există aproximativ *40 de gene V_k diferite*, fiecare dintre ele putând codifica un segment inițial distinct al domeniului variabil k. Aceste gene variabile sunt aranjate în mod *liniar*, separate prin introni și precedate (în plus față de promotori) de o secvență exonică denumită *Leader* (conducătoare), situată în aval față de promotor și care va codifica un scurt peptid care are rolul de a introduce și ghida lanțul ce se sintetizează în reticulul endoplasmatic. Acest peptid leader va fi însă clivat de la nivelul lanțului sintetizat, înainte să aibă loc asamblarea lanțurilor ușoare și grele.
- La o oarecare distanță de grupul genelor V, spre capătul telomeric al ADN, se găsește grupul celor *5 gene J_k*, după care, separată printr-un intron foarte lung, se găsește *singura genă pentru regiunea constantă C_k*, care codifică întreaga porțiune constantă a lanțului k.

Formarea lanțului k începe prin aducerea unei gene V_k și a unei gene J_k în imediata vecinătate una față de alta, fenomen numit *rearanjare genică* (figura 17.5). Genele sunt rearanjate și unite datorită existenței la cele două capete a unor secvențe intronice conservate denumite RSS (*Recombination Signal Sequences* – secvențe semnal de recombinare). Procesul este mediat de enzimele codificate de genele *RAG1* și *RAG2* (*recombination activation genes* – gene de activare a recombinării). Aceste enzime acționează exclusiv la nivelul limfocitelor, iar prezența lor simultană este indispensabilă desfășurării adecvate a procesului.

În cursul procesului de rearanjare, cele două gene V și J, *alese în mod complet aleatoriu*, vor fi unite, dând naștere unei secvențe genice continue; totodată, întregul material genetic care se găsea între cele două gene va fi excizat și îndepărtat. Astfel, ADN limfocitului B care a suferit o rearanjare a genelor lanțului k va conține următoarele regiuni, începând dinspre centromer către telomer: toate genele V_k de dinaintea celei selectate, promotorul și exonul Leader (L) al genei V_k alese, un intron, segmentul genic continuu alcătuit din genele V_kJ_k selectate urmat de genele J_k neselectate, un intron și gena pentru regiunea constantă.

Secvența rearanjată a lanțului ușor este apoi transcrisă de către o ARN-polimerază, începând de la segmentul L până la semnalul stop de după gena pentru regiunea constantă, generând astfel un transcript ARN primar. Urmează apoi un proces de incizare a joncțiunilor exon-intron ale moleculei de ARNm precursor, îndepărtarea intronilor și unirea exonilor (secevențele codante) și un proces de poliadenilare a genei constante. Rezultă astfel ARNm matur care va părăsi nucleul și se va lega ulterior la nivelul ribozomilor. Aici are loc translația și proteina ce se sintetizează va fi dirijată, de către segmentul Leader de la nivelul capătului N-terminal, în interiorul lumenului reticulului endoplasmatic rugos (RER). În RER, secvența Leader este îndepărtată, iar lanțul ușor va putea, abia acum, să se asocieze cu un lanț greu.

Genele *lanțului ușor* λ sunt situate la om pe cromozomul 22. Locusul λ uman conține aproximativ 40 de gene V_λ și 4 gene J_λ despre care se știe că sunt

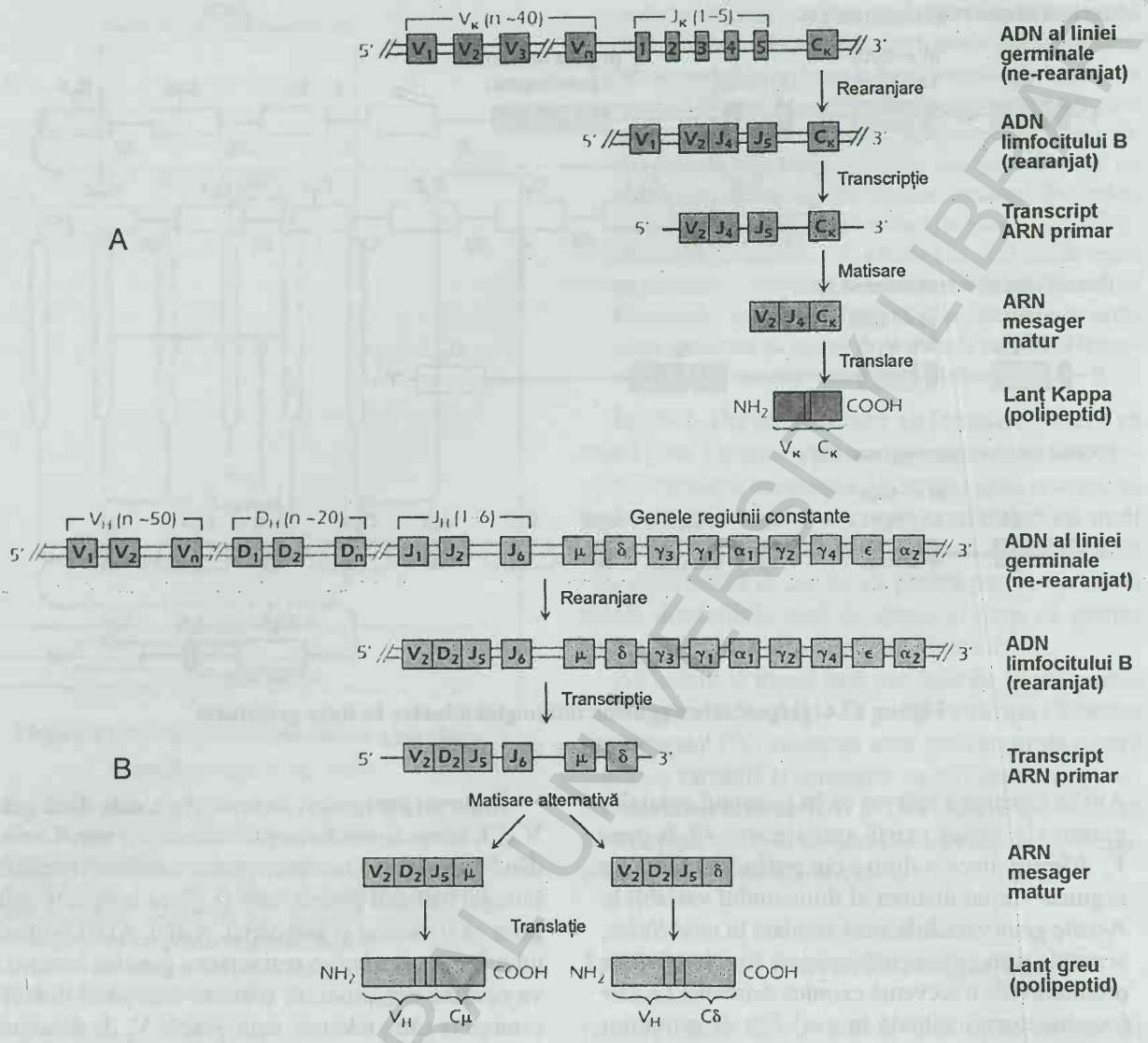


Figura 17.5. Succesiunea evenimentelor care vor conduce la formarea lanțurilor ușoare (A) și grele (B)
(după Benjamini, 2000)

funcționale (pe lângă altele nefuncționale, numite pseudogene). Organizarea locusului λ este diferită de cea pentru k, fiecare genă J_λ fiind asociată cu câte o genă C_λ distinctă (figura 17.4). Sinteza lanțului λ este similară în principiu cu cea a lanțului k: printr-o rearanjare aleatorie, mediată de RAG1 și RAG2, o genă V_λ (care codifică primii 97 de aminoacizi) este unită cu o genă J_λ (care codifică următorii 13 aminoacizi ai regiunii variabile), dar ADN rearanjat va utiliza mai departe acea genă C_λ asociată genei J alese.

2. Formarea lanțurilor grele

Genele lanțului greu (H) sunt situate la om pe cromozomul 14. Organizarea acestor gene este mai complexă decât cea a genelor ce codifică lanțurile ușoare (L) deoarece *există o genă suplimentară D*, care codifică o porțiune a regiunii variabile. Astfel, segmentul genic V_H codifică primii 94 de aminoacizi, iar segmentul genic J_H – secvența curprinsă între aminoacizii 98-113; secvența intermediară, extrem de scurtă (95-97), este codificată de o genă denumită D_H (Diversitate) (figura 17.4). Prin secvențierea directă a genelor de pe cromozomul 14, astăzi știm că la om există, începând de la telomer spre centromer, un grup de 51 de gene V_H, urmate de un grup de 27 de gene D_H, apoi, la o oarecare distanță, 6 gene J_H funcționale.

O altă caracteristică ce particularizează genele lanțurilor grele este prezența în genomul celulelor germinale a unor *gene multiple ce codifică regiunea constantă.* Partea constantă a lanțului greu este responsabilă pentru conferirea așa numitelor *funcții „biologice" ale anticorpilor*, iar conservarea acestor importante funcții efectorii este realizată prin menținerea unui număr limitat de gene pentru regiunea constantă.

Spre deosebire de partea constantă a lanțurilor ușoare, regiunea situată spre capătul C-terminal a

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

lanțurilor grele este cea care hotărăște încadrarea întregii imunoglobuline într-una din cele 5 clase (**izotip**)[4]. Grupul genelor C_H (fiecare dintre ele este flancată de introni) este separat de genele J_H printr-un intron lung. În plus, fiecare genă C_H este formată din mai mulți exoni și introni. Fiecare dintre exoni codifică un domeniu distinct al regiunii constante. Genele regiunii constante sunt aranjate într-o anumită ordine, iar acest aranjament secvențial *nu este întâmplător*, fiind în directă legătură cu ordinea exprimării claselor de imunoglobuline în cursul diferențierii limfocitului B și a răspunsului inițial în IgM la contactul cu un antigen.

Pentru a genera o genă transcriptibilă pentru lanțul greu sunt necesare rearanjări distincte. În aceeași manieră întâmplătoare descrisă anterior, un segment genic D_H oarecare este adus în imediata proximitate a unei gene J_H. Lângă segmentul D_HJ_H care rezultă astfel este adusă ulterior una din genele V_H (figura 17.5). Rearanjările de la nivelul ADN cromozomului 14 vor conduce la următoarea succesiune, dinspre telomer către centromer: promotorul genei V_H, exonul Leader, un scurt intron, segmentul continuu VDJ, un alt intron și întreaga serie de gene constante. Odată rearanjările finalizate, o ARN polimerază se va lega la promotor și va transcrie întreaga secvență (inclusiv intronii). În acest proces de transcripție sunt antrenate și *primele două gene constante*, care sunt Cμ și Cδ. Rezultă astfel un transcript ARN primar care va urma un proces de matisare și poliadenilare diferențiată. Matisarea ARN va conduce în acest caz nu numai la eliminarea intronilor ci și la separarea genelor Cμ și Cδ. Dacă într-o primă etapă, segmentul VDJ va fuziona cu Cμ și astfel primul lanț greu sintetizat de limfocitul B va fi un lanț greu m (iar prima imunoglobulină produsă va fi IgM), în etapa imediat următoare, segmentul VDJ se va asocia, într-o manieră cvasialternativă, atât cu gena Cμ, cât și cu gena Cδ. Consecința acestui proces particular va fi exprimarea simultană, pe suprafața aceleiași celule B, atât a IgM, cât și a IgD, având însă aceeași specificitate, determinată de aceeași combinație distinctă VDJ.

3. Mecanismul rearanjărilor genelor care codifică regiunea variabilă

Rearanjările genelor decurg așa cum au fost descrise mai sus, dar se pot pune firesc două întrebări: cum este realizată asamblarea corectă (întotdeauna o genă V_H se asociază cu o genă D_H și nu direct cu gena J_H) și cum se produce asocierea genelor prin unirea segmentelor genice în ordinea corectă 5'-3', rearanjarea a două gene din același grup (V, D sau J) neavând loc niciodată. Înțelegerea mecanismului a devenit posibilă odată cu identificarea a două secvențe conservate la nivelul ADN din genomul celulelor germinale, fiecare dintre ele constând dintr-un heptamer palindromic și un nonamer bogat în A și T, separate de către o secvență neconservată, formată fie din 12, fie din 23 de perechi de baze azotate. Lungimea acestor „distanțieri" corespunde fie unei spire, fie a două spire complete a helix-ului ADN. Aceste secvențe sunt intronice și se găsesc după fiecare genă V_H, înaintea fiecărei gene J_H[5] și la ambele capete ale genelor D_H. Intronii descriși funcționează ca ținte de recunoaștere – *secvențe semnal* – pentru enzimele responsabile pentru rearanjarea genelor și sunt denumite RSS (*Recombination Signal Sequence*) (figura 17.6).

Rearanjarea genelor este rezultatul acțiunii mai multor enzime, denumite generic „*recombinaze*". Primele astfel de recombinaze responsabile pentru procesele care au loc în limfocite au fost descrise în 1990: genele *RAG1* și *RAG2* (*Recombination Activating Gene*) codifică proteine care, doar dacă acționează împreună, sunt capabile să inducă rearanjarea VDJ sau VJ[6].

Rearanjările genelor V(D)J – destinate părților variabile a imunoglobulinelor – pot fi „productive" sau „non-productive". O *rearanjare productivă* este aceea care va conduce la o secvență VJ sau VDJ care să poată fi transcrisă și apoi translată în întregime. O *rearanjare neproductivă* decalează cadrul de lectură generând codoni stop care vor bloca translația, iar celulele vor fi eliminate prin apoptoză. Deși se consideră că tăierea ADN se face în mod precis la joncțiunea dintre exon și intronul RSS, procesul ulterior de fuziune a segmentelor genice este adesea imperfect. Această imprecizie reprezintă o sabie cu două tăișuri. Pe de o parte, conferă un imens avantaj limfocitelor, conducând la generarea unui surplus de diversitate, dar, pe de altă parte, poate conduce la rearanjări neproductive.

Limfocitele sunt celule somatice diploide și conțin deci atât cromozomi materni, cât și paterni. Toate genele implicate în codificarea lanțurilor pentru imunoglobuline (ca și cele pentru TCR – *T cell receptor*, receptorul

4. Partea constantă a lanțului greu, codificată de o anumită genă constantă, permite încadrarea întregii imunoglobuline într-una din cele 5 clase (izotipuri): A, D, E, G, M. De fapt, există 9 tipuri distincte de lanțuri grele, ceea ce permite distincția unor clase și subclase: IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, IgA_2, IgM, IgD, IgE.
5. Sistemul este similar în cazul genelor ce codifică pentru lanțurile ușoare.
6. Recombinazele codificate de către RAG1 și RAG2, alături de enzima TdT (*Terminal deoxinucleotidil Transferaza*) sunt singurele care se găsesc doar în limfocite.

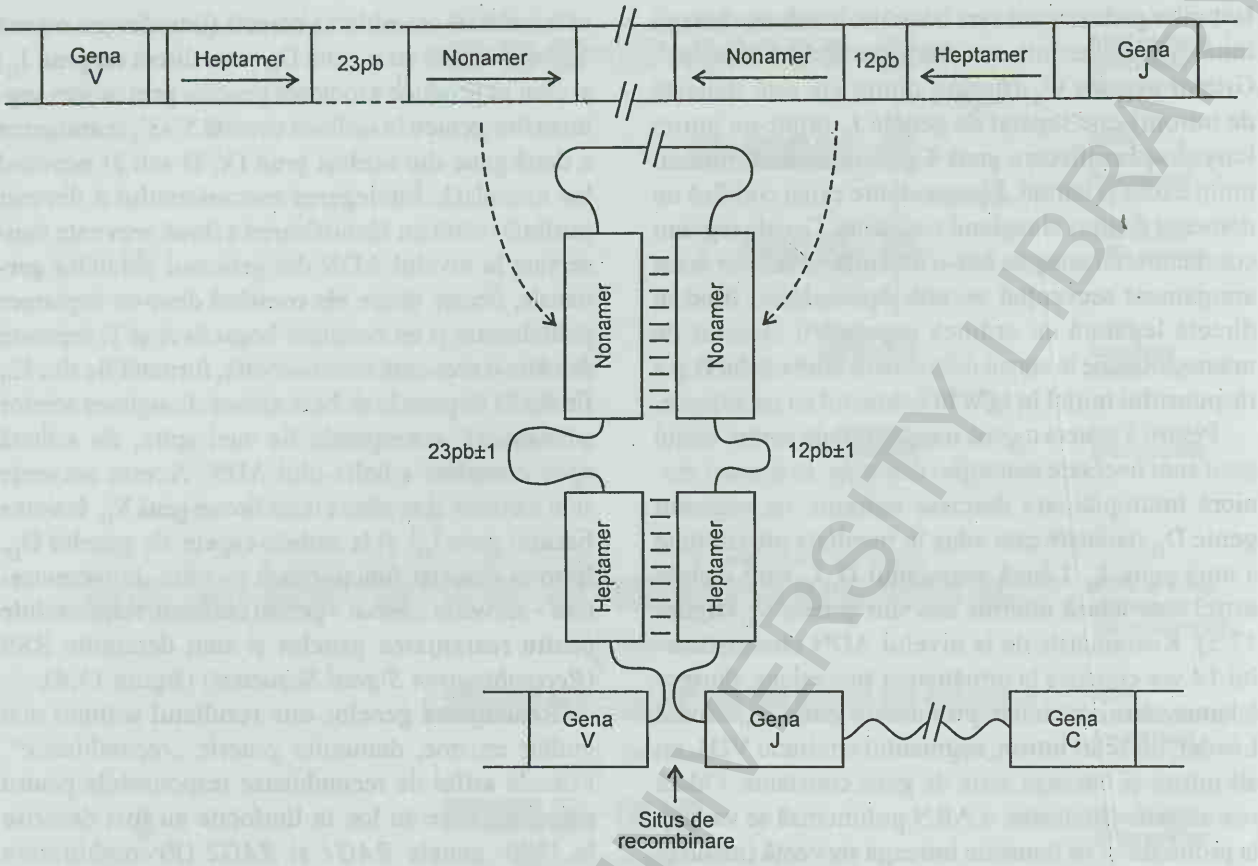


Figura 17.6. Secvențele Semnal de Recombinare (RSS)

(modificat după Roitt, 1998; Kaplan și Delpech, 1993)

RSS sunt recunoscute de enzimele RAG-1 și RAG-2, apoi o catenă ADN este tăiată și se formează un „ac de păr". Acesta este ulterior clivat și se generează situsuri pentru adăugarea de nucleotide (regiunea P). În plus, sunt inserate nucleotide suplimentare de către enzima TdT (regiunea N). Procesul se încheie cu fuziunea secvențelor codante și transcripția acestora.

pentru antigen al limfocitului T) sunt *gene dominante*. Cu toate acestea, limfocitelor nu li se permite decât utilizarea alelelor de pe un singur cromozom. Fenomenul (unic limfocitelor), a fost denumit „**excluzie alelică**". Singura rearanjare care are loc simultan pe ambii cromozomi este cea dintre genele D_H și J_H, toate celelalte desfășurându-se fie pe un cromozom, fie pe cel pereche. În acest fel, fiecare limfocit va reține doar câte o rearanjare productivă VDJ și respectiv VJ, astfel încât vor fi produse lanțuri ușoare și grele având o parte variabilă identică. Asamblarea lor va conduce în final la obținerea de receptori pentru antigen cu o specificitate unică.

4. Factori care contribuie la generarea diversității imunoglobulinelor

Analizând retrospectiv primele două teorii emise cu privire la diversitatea receptorilor pentru antigen, teoria liniei germinale și teoria somatică, constatăm că fiecare dintre ele conține elemente validate ulterior experimental.

Prezentăm în continuare o sinteză a mecanismelor care determină, în ultimă instanță, obținerea acestui număr remarcabil de receptori pentru antigene:

(1) În primul rând, trebuie remarcat că, spre deosebire de oricare alte proteine sintetizate în organism, codificarea lanțurilor imunoglobulinelor este asigurată *de mai multe gene*, care, ulterior, vor fi asamblate într-o secvență contiguă.

(2) Fiecare dintre aceste gene este aleasă dintr-un *rezervor genic* alcătuit din mai multe gene, perfect individualizate. Cel mai bine reprezentat, din acest punct de vedere, este grupul genelor V, atât în cazul sintezei lanțurilor grele, cât și a celor ușoare.

(3) Mecanismul cel mai important, care creează el însuși diversitate și oferă, în plus, posibilitatea intervenției ulterioare a unor mecanisme adiționale, este reprezentat de *rearanjările aleatorii*, guvernate de recombinaze. Faptul că aceste reasortări genice se produc într-o o manieră întâmplătoare, fără să existe reguli care să impună combinații

BCUIAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

particulare, lasă practic posibilitatea formării oricărei combinații de gene[7].

(4) *Paratopul* imunoglobulinelor este format din combinația *părții variabile a unui lanț greu și a părții variabile a unui lanț ușor*. Asocierea dintre un lanț greu și unul ușor este de asemenea *aleatorie*; într-o celulă B oarecare, întâmplarea poate conduce la sinteza unor lanțuri H și L oarecare, iar acestea, odată asamblate, vor conduce la o combinație particulară[8].

(5) Imprecizia unirii genelor conduce la ceea ce a fost denumită „*diversitate joncțională*" sau „flexibilitate joncțională". Așa cum menționam anterior, tăierea dintre RSS și secvența codantă pare să fie precisă, în schimb, unirea secvențelor codante este, cel mai adesea, imprecisă. *Joncțiunea genelor* va deveni în acest fel un loc major de generare a diversității, dat fiind faptul că acest proces este unul practic necontrolabil.

(6) *Regiunea P de adiție* apare după tăierea ADN. Dacă prima clivare apare la joncțiunea RSS-exon, în etapa următoare, nucleotidele de la acest capăt vor face în așa fel încât, în momentul tăierii complete a ambelor catene, acestea să fie unite între ele printr-o buclă, așa numitul „ac de păr". Fenomenul se produce la capetele ambelor gene care urmează să fie fuzionate și, pentru ca unirea acestor gene să poată avea loc, „acele de par" trebuie ulterior și ele tăiate. Această a doua tăiere de către o endonuclează se face, cel mai adesea, asimetric, astfel încât una dintre catene va deveni mai lungă decât cealaltă. Este necesară intervenția unor enzime de reparare care să adauge nucleotide complementare celor prezente la nivelul catenei mai lungi. Se creează astfel o secvență palindromică la nivelul joncțiunii, motiv pentru care această regiune a fost denumită „*regiune P de adiție*".

(7) *Regiunea N de adiție* este creată cu ajutorul unei enzime numite TdT (*terminal deoxinucleotidil transferase*). Rolul TdT este acela de a adăuga nucleotide la capetele genei D în cursul unirii acesteia la gena J sau la gena V. Numărul maxim de baze azotate pe care enzima le poate alipi genei D este de 15, dar numărul de nucleotide transferat este aleatoriu și astfel se formează secvențe complet diferite. Ceea ce este important de subliniat în acest moment este că *diversitatea joncțională*, adiția în regiunea P și în regiunea N conduc la apariția unor secvențe genice complet noi, care nu existau inițial în genomul celulelor germinale. Aceste mecanisme sunt cele care reușesc să ridice diversitatea Ig până la cifra avansată anterior, de aproximativ 10^{10} specificități diferite.

(8) Un alt mecanism implicat în generarea diversității este constituit de *mutațiile somatice* ce se produc întâmplător, printr-un mecanism încă neelucidat, la nivelul genelor rearanjate (VJ sau VDJ). Un element deosebit este reprezentat de *frecvența crescută* (hipermutații) cu care aceste mutații apar, de cel puțin o sută de mii de ori mai înaltă decât frecvența cu care apar mutațiile spontane la nivelul oricăror alte gene[9].

5. Asocierea genei constante și comutarea de clasă

Organizarea genelor ce codifică partea constantă a lanțurilor este diferită de cea responsabilă pentru partea variabilă. În cazul lanțurilor ușoare, există o singură genă C_k și mai multe gene C_λ, dar partea constantă a lanțurilor ușoare nu influențează nici paratopul și nici clasa imunoglobulinei respective. De mult mai mare importanță este însă partea constantă a lanțurilor grele, responsabilă pentru determinarea *izotipului* și a funcțiilor numite „biologice" ale anticorpilor. Genele pentru regiunile constante sunt mult mai lungi decât cele pentru regiunile variabile, fiind alcătuite dintr-o serie de exoni distincți ce codifică fiecare în parte domeniile extracelulare, regiunea „balama" (acolo unde este cazul), domeniul transmembranar și coada intracitoplasmatică.

7. Un calcul simplu ne arată că în cazul lanțurilor grele, dacă orice genă D se poate combina cu orice genă J și apoi cu orice genă V, numărul de combinații posibile pe care îl putem obține este de $51(V_H) \times 27(D_H) \times 6(J_H) = 8.262$. În cazul lanțurilor ușoare de tip k, calculul ne conduce la $40(V_k) \times 5(J_k) = 200$ de combinații, respectiv 30(Vl) x 4(Jl) = 120 de combinații pentru lanțurile ușoare λ.

8. În cazul asocierii unui lanț greu cu un lanț ușor k putem obține un număr de 8.262 x 200 = 1.652.400 de variante. Această sumă, deși impresionantă, este totuși departe de numărul de specificități existente în organism, care alcătuiesc repertoriul imunologic și care este estimat între 10^{10} și 10^{11}. Surplusul de diversitate este oferit însă de *mecanisme suplimentare*, care nu s-ar fi putut, totuși, manifesta în absența acestui sistem cu totul deosebit prin care gene, situate la distanță între ele, sunt alese întâmplător, alăturate și unite pentru a forma o genă hibrid.

9. Se pare că anumite motive nucleotidice și secvențe palindromice de la nivelul genelor rearanjate (VJ sau VDJ) sunt în mod particular susceptibile în fața acestui mecanism, în limfocitele B mature fiind afectate preferențial acele secvențe care codifică regiunile hipervariabile (CDR). În mod normal, hipermutațiile somatice au loc în centrul germinal (deci în organele limfoide secundare), ca o consecință a expunerii la antigen; acele limfocite B care au receptorul cu cea mai mare afinitate pentru antigenul respectiv vor fi selectate în mod preferențial, vor supraviețui și tot dintre acestea se vor diferenția și celulele cu memorie. Procesul a fost denumit „*maturație de afinitate*".

O caracteristică a genelor C_H este prezența unor gene multiple în genomul celulelor germinale, corespunzătoare fiecărei clase și subclase de imunoglobuline. Ultima genă J_H este separată de prima genă C_H printr-un intron foarte lung. În plus, fiecare genă C_H este precedată nu numai de promotor, dar și de un *amplificator* al transcripției (*enhancer*) precum și de câte o secvență intronică de comutare („*switch*"), caracteristică fiecărei gene în parte; o excepție notabilă este reprezentată de gena Cδ, lipsită de secvența de comutare. Secvențele de comutare sunt destul de lungi, fiind alcătuite din mai multe motive repetitive. Rolul acestor introni este acela de a permite asocierea la acest nivel a unor recombinaze care sunt diferite pentru fiecare clasă în parte.

În timpul diferențierii limfocitului B, genele Cμ și Cδ, cele mai apropiate de genele J, sunt primele transcrise. Ca un element particular, ambele gene sunt transcrise simultan, probabil tocmai datorită absenței secvenței de comutare din fața genei Cδ, precum și a distanței de numai 5 kb dintre cele două gene. Astfel, transcriptul primar, cu o lungime de aproximativ 15 kb, conține genele VDJCμCδ. Dintre cele patru situsuri de poliadenilare, primele două sunt asociate genei Cμ, iar celelalte două genei Cδ. Dacă transcriptul primar este clivat și poliadenilarea are loc la nivelul situsului 2, atunci ARN mesager va conține întreaga secvență a genei Cμ și va rezulta astfel forma membranară a lanțului. Dacă însă poliadenilarea se face la nivelul situsului 4, atunci, prin tăierea ARN, secvența Cμ va fi înlăturată și se va ajunge la ARNm care codifică forma membranară a lanțului Cδ. Acest proces se produce simultan, astfel că secvența VDJ are posibilitatea să se unească, de o manieră alternativă și cu gena Cμ și cu gena Cδ. În consecință, limfocitele B mature, dar *naive*, vor exprima simultan pe suprafață atât IgM, cât și IgD, dar cu aceeași specificitate, determinată de către aceeași combinație VDJ.

După stimularea antigenică însă, expresia IgD este pierdută, iar IgM tinde să fie înlocuită, în cele mai multe cazuri, cu un alt izotip, fenomen denumit „**comutare de clasă**". Astfel, gena Cμ va fi înlocuită cu o alta, situată spre capătul 3' al ADN, enzima responsabilă pentru acest proces fiind AID (*activation induced cytidine deaminase*)[10]. Trebuie subliniat însă că acest proces are loc în timpul vieții adulte a limfocitului B, noi rearanjări genice nemaifiind posibile; odată ce limfocitul a ajuns la o anumită reasortare productivă, aceasta va deveni permanentă pentru celula în cauză. Astfel, comutarea de clasă nu influențează specificitatea imunoglobulinei respective (figura 17.7).

De asemenea, trebuie precizat că procesul de comutare de clasă are loc în contextul unui răspuns imun față de un antigen T-dependent, cu alte cuvinte, un răspuns imun în care sunt implicate și limfocitele T helper, prin intermediul anumitor seturi de citokine și molecule de suprafață[11].

În cazul în care limfocitul B s-a diferențiat în plasmocit, sinteza imunoglobulinelor de suprafață este înlocuită cu cea de *anticorpi*. Diferența nu se regăsește la partea variabilă (în mod esențial, specificitatea

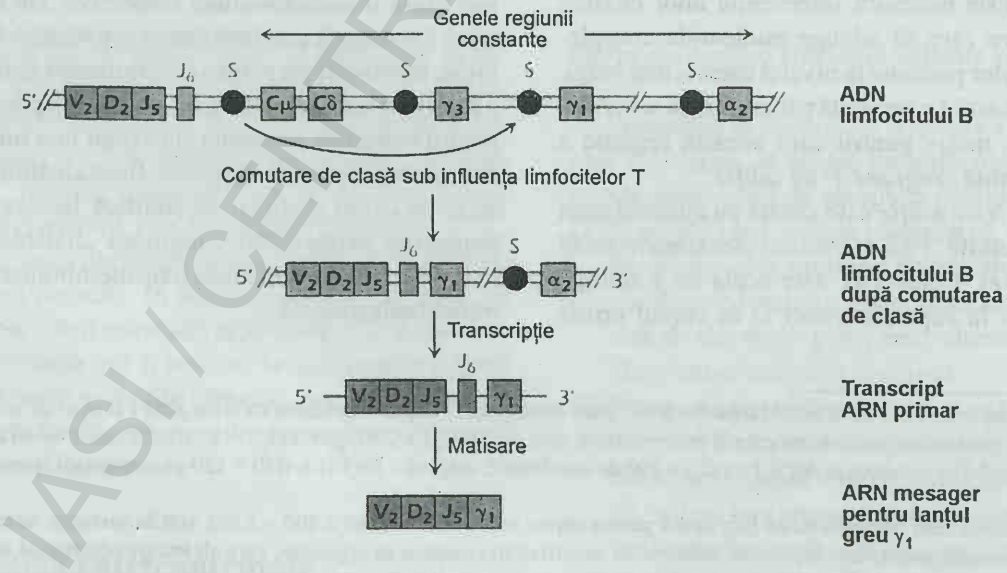


Figura 17.7. Mecanismul propus pentru comutarea de clasă de la IgM la IgG_1
(după Benjamini, 2000)

10. AID este exprimată doar în limfocitele B din centrii germinali. Are rolul de a converti citidina în uridină și este, în egală măsură, responsabilă și pentru procesul de hipermutație somatică.
11. Răspunsul față de antigenele T independente, în absența intervenției limfocitelor T helper, nu conduce nici la memorie imunologică și nici la comutare de clasă.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

anticorpilor este aceeaşi cu a imunoglobulinelor de pe suprafaţa limfocitelor B stimulate iniţial) ci la nivelul secvenţei situată spre capătul C-terminal al părţii constante. Posibilitatea sintezei unei forme sau a alteia se datorează existenţei unor exoni suplimentari, denumiţi M1 şi M2, localizaţi în aval de exonul responsabil pentru ultimul domeniu extracelular constant. Exonul M1 codifică porţiunea transmembranară, iar M2 porţiunea intracitoplasmatică. Dacă poliadenilarea se produce la nivelul situsului 1 de la nivelul transcriptului primar, atunci exonii M1 şi M2 sunt pierduţi şi se va ajunge la forma secretată a lanţului greu respectiv. Domeniul C terminal al formei secretate diferă astfel ca formă şi funcţie de cel al moleculei inserate în membrană, anticorpii prezentând o secvenţă hidrofilică (*„tail-piece"*).

În concluzie, formarea imunoglobulinelor este consecinţa unui proces genetic absolut distinct, unic receptorilor pentru antigene, cu o mulţime de excepţii de la regulă. Astfel, un singur peptid va trebui codificat de mai multe gene, iar elementul principal al întregului proces este reprezentat de rearanjarea la întâmplare a mai multor gene destinate regiunii variabile. În plus, genele care codifică regiunile constante sunt fuzionate doar la nivel de ARN, ceea ce va crea premizele asocierii alternative ale genelor Cμ şi Cδ, într-o primă instanţă şi apoi ale comutării de clasă. În ciuda faptului că genele implicate în formarea imunoglobulinelor sunt dominante, datorită excluziei alelice vor putea fi exprimate doar alele de pe un cromozom sau altul.

C. Mecanismele genetice care stau la baza generării diversităţii TCR

Între imunoglobuline şi **receptorul pentru antigen al celulei T (TCR)** există multe asemănări din punct de vedere structural. Domeniile extracelulare care alcătuiesc cele două lanţuri sunt, ca şi la Ig, constante şi variabile, întreaga porţiune extracelulară a TCR seamănă cu fragmentul Fab al anticorpilor[12], iar componenta care asigură recunoaşterea este asociată cu molecula constantă CD3 (analogă Igα şi Igβ, cu rol în transmiterea intracelulară a semnalului) (figura 17.8).

Mecanismul formării receptorului pentru antigen al limfocitelor T prezintă foarte multe aspecte extrem de asemănătoare cu cel al formării imunoglobulinelor, implicând, în esenţă, rearanjări genice V(D)J şi diversitate joncţională. Analiza lanţurilor TCR demonstrează, de asemenea, existenţa regiunilor hipervariabile, responsabile pentru formarea efectivă a situsului de interacţiune al receptorului.

Din aceste motive, am ales să ne concentrăm în special asupra diferenţelor de formare a celor două categorii de receptori. O primă deosebire notabilă este reprezentată de existenţa a două tipuri de TCR: TCR 1 (γδ) şi TCR 2 (αβ). Indiferent de tipul de TCR, acesta este asociat la nivel transmembranar, prin legături electrostatice, cu aceeaşi moleculă CD3.

Există 4 familii de gene la nivelul ADN din genomul celulelor germinale, dedicate câte unui anumit tip de lanţ (figura 17.9). Genele care codifică lanţurile α şi δ sunt grupate pe cromozomul 14 (în altă regiune decât genele pentru lanţul greu al imunoglobulinelor), iar genele lanţurilor β şi γ pe cromozomul 7. Localizarea particulară a genelor δ nu este întâmplătoare. Atunci când celula reuşeşte să ajungă la o rearanjare productivă a genelor pentru lanţul α, genele lanţului δ sunt deletate; astfel, la nivelul unui anumit limfocit T, nu poate exista o exprimare simultană de TCR αβ şi TCR γδ.

Reasortarea genelor se face sub influenţa enzimelor codificate de aceleaşi gene *RAG1* şi *RAG2*, sistemul de recunoaştere a genelor este reprezentat de aceeaşi secvenţă heptamer/distanţier/nonamer, fuziunea secvenţelor genice conduce la imprecizie joncţională, la care se adaugă imprecizia inserţională. Existenţa mai multor gene D sau J, grupate distinct, poate conduce la unele diferenţe de rearanjare[13]. *Repertoriul TCR* este, se

12. Conformaţia TCR pare să fie mai rigidă decât a Ig datorită interacţiunilor dintre domeniile fiecărui lanţ, posibil şi datorită diferenţei dintre sistemul de recunoaştere a Ag propriu al fiecărui receptor.
13. Cele două grupuri de gene DβJβ sunt denumite Dβ1/Jβ1 (o genă D şi 6 gene J funcţionale) şi, respectiv, Dβ2/Jβ2 (o genă D şi 7 gene J funcţionale). Genele V se pot rearanja cu combinaţii DJ din oricare din cele două grupuri, dar utilizarea unei combinaţii DJ din al doilea grup va impune utilizarea genei $Cβ_2$. În plus, în cazul genelor TCRβ există câteva diferenţe semnificative faţă de genele IgH. Astfel, în timp ce segmentele genice Vβ au la capătul 3' un RSS-23 (ca şi la Ig), segmentele genice Dβ sunt precedate de un RSS-12 şi urmate de un RSS-23, iar segmentele genice Jβ sunt precedate de un RSS-12. Ca urmare, un segment genic V se poate recombina nu numai cu un segment genic D, dar şi direct cu un segment genic J, după cum mai multe segmente genice D se pot combina între ele.

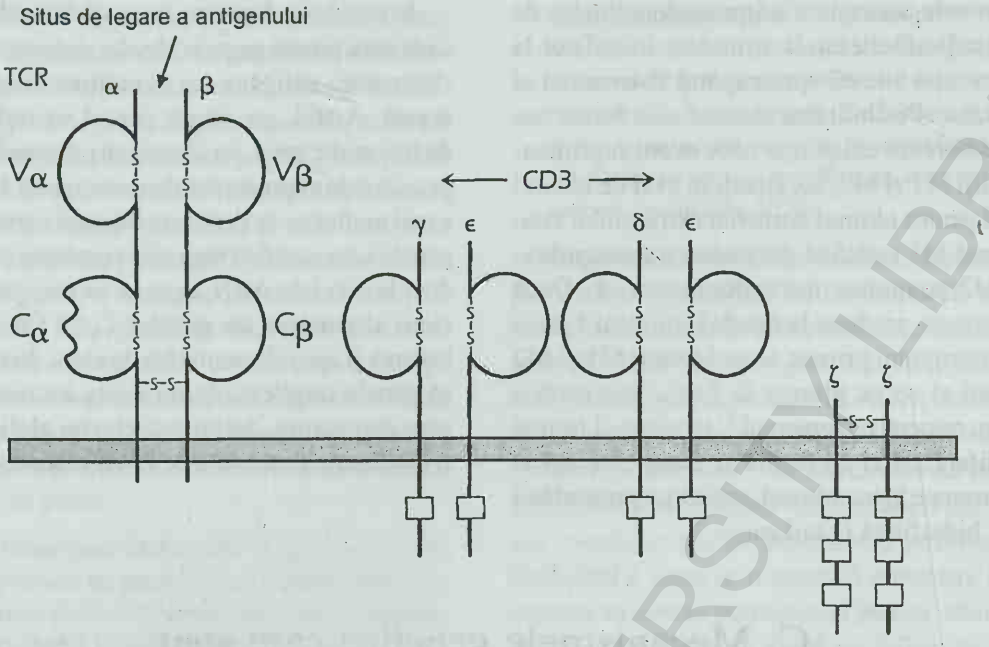


Figura 17.8. Structura receptorului pentru antigen al limfocitului T (TCRαβ), asociat cu molecula CD3

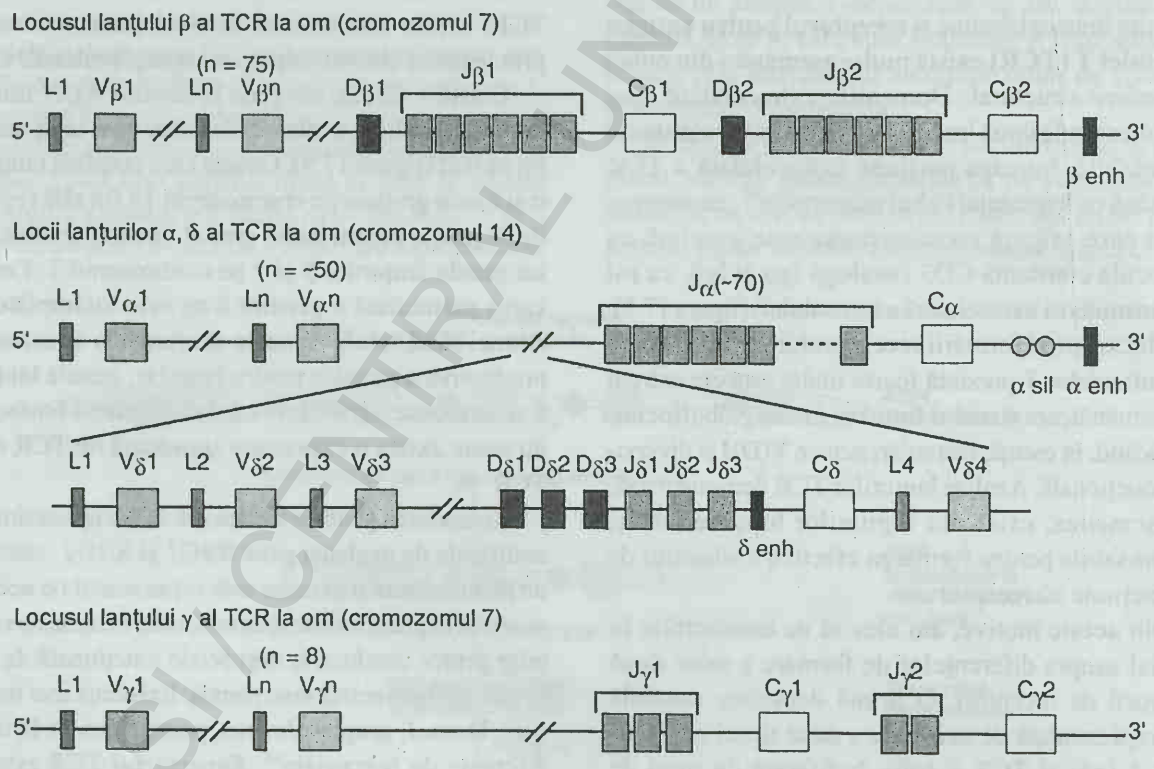


Figura 17.9. Organizarea genelor TCR în linia germinală

(după Nussbaum *et al.*, 2001)

pare, mult mai mare decât al imunoglobulinelor, mai ales datorită unei enorme variabilități joncționale și inserționale (regiune N de adiție, regiune P de adiție). Aceleași mecanisme reprezintă, în același timp, și un factor de risc, putând conduce la rearanjări neproductive care fie fac produsul nefuncțional, fie fac ca secvența de ADN să nu mai poată fi citită (introducerea unor codoni stop).

O diferență importantă între procesele de formare ale celor doi receptori este aceea că, în urma activării antigenice, genele TCR nu suferă hipermutații somatice. Absența mutațiilor întâmplătoare reprezintă o măsură

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de siguranță împotriva apariției limfocitelor autoreactive, cu atât mai importantă cu cât limfocitele T au un sistem de recunoaștere particular, care vizează nu doar antigenul – *non-self* –, ci și molecula de MHC (*Major Histocompatibility Complex* – complexul major de histocompatibilitate) – *self* – care prezintă acest antigen.

Formarea TCR începe în corticala timusului, într-o etapă de dezvoltare a timocitelor[14] în care acestea și-au dobândit capacitatea exprimării moleculei CD3, enzima TdT este de asemenea prezentă, dar nici una dintre moleculele co-receptor (CD4 și CD8) nu a apărut încă – motiv pentru care celulele sunt denumite dublu negative (DN).

Primele gene care încep să se rearanjeze, mai mult sau mai puțin simultan, sunt cele pentru lanțurile β și γ. Dacă genele γ suferă o reasortare productivă, începe și rearanjarea genelor δ. Dacă atât genele pentru lanțurile γ, cât și cele pentru lanțurile δ sunt rearanjate productiv, cu alte cuvinte transcripția poate avea loc și poate începe sinteza lanțurilor, alte rearanjări nu vor mai avea loc și acele timocite vor rămâne γδ și se vor dezvolta, pe o cale diferită, în celule DN, CD3+ γδ. Acestea vor reprezenta aproximativ 5% din totalul timocitelor la adult.

Majoritatea timocitelor dublu negative aleg însă o altă cale de dezvoltare. Dacă rearanjările γ și/sau δ nu sunt funcționale, vor continua rearanjările β. Odată ce celula a ajuns la o rearanjare TCRβ productivă sunt suprimate alte rearanjări ale lanțurilor β-TCR (componentă a fenomenului de excluzie alelică). Astfel sunt selectate acele timocite care exprimă lanțul β pentru o expansiune și maturare ulterioară. Din acest moment, pot fi declanșate rearanjările pentru lanțul α, iar acele timocite care vor ajunge la rearanjări productive vor fi capabile să exprime pe suprafață un TCR αβ complet format, chiar dacă la nivele scăzute. Timocitele au devenit dublu pozitive și se găsesc la nivelul corticalei profunde a timusului. De aici încolo, aceste celule vor suferi o serie de procese complexe, cunoscute sub numele de selecție pozitivă și negativă.

Selecția pozitivă are loc la nivelul corticalei profunde, sub influența celulelor epiteliale corticale. Acele timocite care sunt capabile să recunoască prin intermediul TCR-ului moleculele MHC (cu o afinitate medie) sunt selectate pozitiv, vor supraviețui și vor primi semnale care le vor determina să prolifereze. Consecința acestui fenomen este ceea ce se numește *„restricție MHC"*, sau, cu alte cuvinte, capacitatea limfocitelor T de a recunoaște antigenul doar în contextul moleculelor MHC proprii organismului respectiv. Celulele care nu corespund acestui criteriu sunt eliminate prin apoptoză.

Excluzia alelică funcționează cu maximă strictețe în cazul formării imunoglobulinelor. În cazul TCR-ului însă, dacă pentru lanțul β excluzia alelică pare să reprezinte regula, în cazul lanțurilor α este mai puțin strictă. În cazul în care se produc rearanjări productive pe ambii cromozomi, cele două lanțuri a diferite vor conduce la existența simultană a două TCR-uri cu specificități antigenice diferite. Deși nu există un consens asupra numărului de astfel de limfocite T mature circulante, se pare că în astfel de situații doar unul dintre cei doi receptori reușește să treacă de procesele de selecție (în special de selecția pozitivă și ca urmare să fie MHC-restricționat).

Numărul celulelor care posedă un receptor corespunzător din acest punct de vedere este mic și, ca urmare, o serie din celulele care nu au fost selectate pozitiv au posibilitatea să își *reia rearanjările* pentru lanțul α. Dacă noua rearanjare va fi productivă, există potențialul de a conduce la o nouă specificitate. Acest fenomen este denumit „editare", iar timocitul căruia i se oferă această șansă va trebui să treacă din nou prin procesul de selecție pozitivă.

La nivelul joncțiunii cortico-medulare, unde se găsesc celule cu origine hematogenă (macrofage și celule dendritice) și mai departe în corticala medulară, sub influența celulelor epiteliale de la acest nivel, are loc procesul de *selecție negativă*[15]. Eliminarea prin procesul de selecție negativă a timocitelor care poartă receptori de mare afinitate pentru molecule MHC *self* singure sau pentru antigenul *self* prezentate de MHC, conduce la toleranță față de *self*. Deoarece procesul are loc în timus, este denumit *toleranță centrală*. Sunt astfel practic eliminate fizic un număr important de limfocite autoreactive[16].

Recunoașterea unui tip de MHC sau altul are o consecință suplimentară: acele timocite care au recunoscut un MHC I se vor diferenția în continuare în **limfocite T citotoxice** (CD8+ CD4-), iar cele care au recunoscut MHC II se vor diferenția în **limfocite T helper** (CD4+ CD8-).

14. Limfocitele T din timus, aflate în plin proces de diferențiere, sunt denumite timocite.
15. Selecția pozitivă a limfocitului B are altă semnificație (exprimarea unui receptor intermediar); selecția negativă se referă însă de asemenea la eliminarea limfocitelor B autoreactive.
16. Acest proces nu este perfect; va continua în periferie, dar aici vor fi implicate mai degrabă alte mecanisme decât inducerea apoptozei celulelor.

BCU IAȘI / IAȘI UNIVERSITY LIBRARY

D. Complexul major de histocompatibilitate

Complexul major de histocompatibilitate (MHC) este un sistem multigenic şi polimorfic, situat pe braţul scurt al cromozomului 6, cu rol fundamental în activarea şi reglarea răspunsul imun. Rolul proteinelor codificate de genele MHC, în special al celor exprimate ca molecule membranare, a fost pus iniţial în legătură cu rejetul grefelor, de unde şi numele de „histocompatibilitate" atribuit de către George Snell (premiul Nobel în 1980)[17].

1. Genele MHC

MHC se întinde pe o lungime de aproximativ 2-3 centimorgani (aproximativ 4 x 10^6 kilobaze), în interiorul căreia au fost identificate peste 300 de gene (figura 17.10). Pe baza diferenţelor structurale şi funcţionale genele ce alcătuiesc MHC sunt împărţite în trei categorii; două dintre acestea, genele de clasă I şi de clasă II, conţin gene ce codifică *antigenele leucocitare umane (HLA – Human Leukocyte Antigen)*, molecule situate pe suprafaţa celulară care joacă un rol important în iniţierea răspunsului imun, prin prezentarea antigenelor limfocitelor T helper $CD4^+$ şi limfocitelor T citotoxice $CD8^+$, care nu pot recunoaşte antigenul dacă acesta nu este asociat cu o moleculă HLA pe suprafaţa celulelor care le prezintă antigenul[18]. Deci, moleculele HLA sunt implicate în recunoaşterea antigenului, interacţiunile dintre limfocite, dezvoltarea toleranţei la *self* şi respingerea transplantului. A treia categorie de gene MHC nu sunt gene HLA şi codifică alte proteine.

a) Genele de clasă I sunt reprezentate de genele HLA clasice: HLA-A, HLA-B şi HLA-C, care codifică molecule (antigene) de clasă I exprimate pe membrana tuturor celulelor nucleate[19] şi pe plachete. Fiecare din aceste gene prezintă, în populaţie, mai multe alele. În acord cu OMS, în nomenclatura lor este identificat mai întâi locusul, urmat de numărul de identificare al alelei, eventual de un număr care să indice subtipul: de exemplu HLA-A*0201.

> În afară de genele HLA I clasice, există o mulţime de gene ce codifică pentru produşi „non-clasici", denumite la om HLA-E, F, G, H, J şi X, la care se adaugă o familie relativ recent descoperită, denumită MIC (MHC I chain-related): A, B, C, D, E.

Moleculele (antigenele) de clasă I sunt alcătuite din două subunităţi polipeptidice: lanţurile α polimorfice (codificate de genele HLA) şi un polipeptid nepolimorfic, β_2 microglobulina (codificată de o genă situată pe cromozomul 15) (figura 17.11).

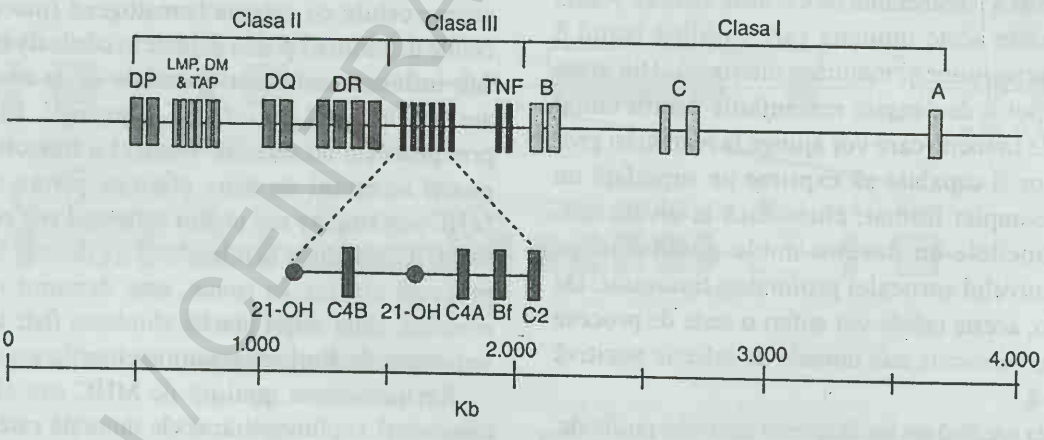


Figura 17.10. Harta genetică a HLA de pe cromozomul 6
(adaptat după Goldsby, Kindt şi Osborne, 2000)

17. În afară de complexul major, există şi un grup denumit minor (mHC), a cărui importanţă a devenit evidentă în contextul supravieţuirii pe termen lung a organelor grefate.
18. De vreme ce majoritatea celulelor din organism au pe suprafaţă fie molecule MHC I, fie MHC II, care pot prezenta peptide limfocitelor T, toate ar trebui denumite celule prezentatoare de Ag. Prin convenţie însă, această denumire revine doar celulelor care posedă molecula MHC II şi prezintă Ag-nul limfocitelor Th, (LyT CD4+), în timp ce acele celule care prezintă un Ag în cupa MHC I limfocitelor Tc (LyT CD8+) sunt denumite celule-ţintă.
19. MHC II este absent pe celulele epiteliului corneei (expresie nedectabilă), în regiunea exocrină a pancreasului, pe celulele acinare ale parotidei, pe neuronii din SNC, pe celulele trofoblastului vilos, iar pe majoritatea ţesuturilor endocrine expresia este foarte scăzută.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UMF IAŞI

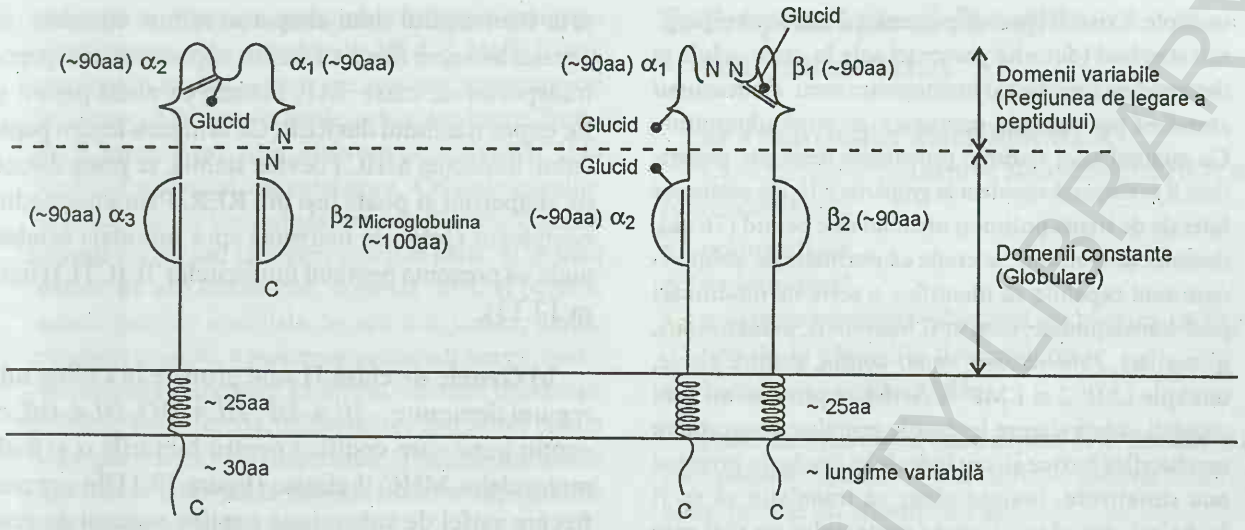


Figura 17.11. Heterodimerii MHC I şi MHC II

Lanţul β_2 microglobulină este constant şi este codificat de o genă aflată în afara complexului genic MHC

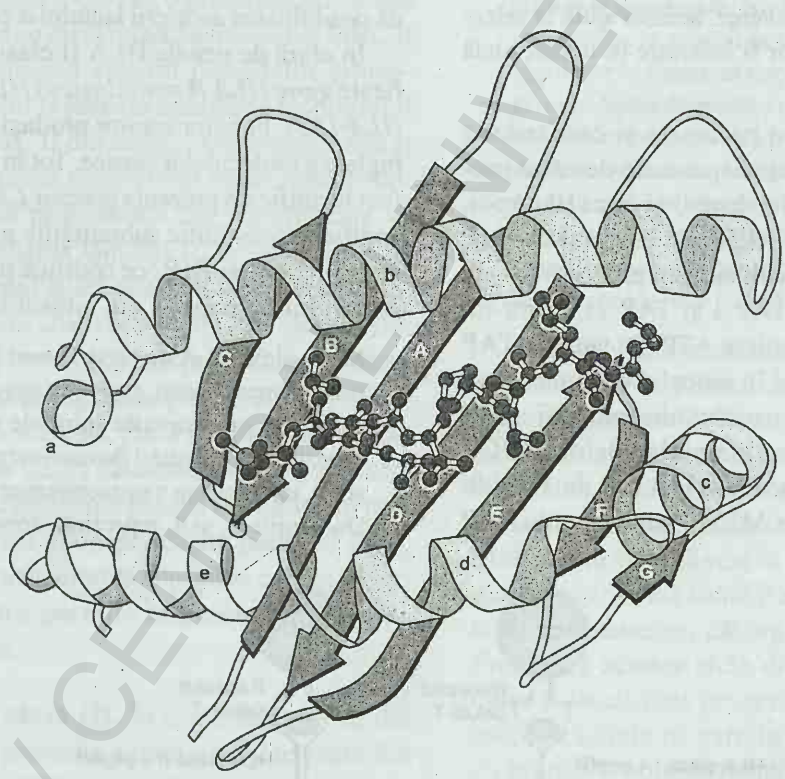


Figura 17.12. Structura cristalografică a cupei MHC I

(după Benjamini, 2000)

Lanţul α este format din trei domenii extracelulare (α_1, α_2 şi α_3), un domeniu transmembranar şi un domeniu intracitoplasmatic, fiecare dintre acestea fiind codificate de exoni distincţi. β_2 microglobulina interacţionează cu toate domeniile extracelulare ale lanţului α, fiind un element esenţial pentru plierea corectă a acestuia şi stabilitatea sa structurală. Domeniile α_1 şi α_2 reprezintă domeniile *variabile* ale moleculei şi participă la formarea unei structuri speciale, care are forma unei „cupe", formată dintr-un planşeu alcătuit din 8 foi β pliate antiparalele şi 2 margini sub formă de α helix-uri (figura 17.12). Funcţia cupei este aceea de a prezenta peptide antigenice limfocitelor T citotoxice – CTL).

Celulele posedă o cale de degradare care asigură *turn-over*-ul normal al proteinelor. Aceeaşi cale de degradare este utilizată şi de antigenele endogene în vederea prezentării în cupa MHC I. Este implicat un organit non-lizozomal, cu funcţie de protează multifuncţională, denumit **proteasom**, standard sau imuni.

Proteasomii sunt complexe de cca 700 kDa, formate din mai multe subunităţi, care posedă activităţi catalitice

BCU IASI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

multiple. Există 2 tipuri de proteasomi: „house-keeping" sau standard (datorită prezenței sale în orice celulă și datorită funcției sale) și imunoproteasomi. *Proteasomii standard* pot degrada conjugate proteină-ubiquitină. Cu ajutorul unei enzime, proteinelor destinate proteolizei li se atașează covalent la grupările NH_2 ale catenelor laterale de lizină polimeri ale unui mic peptid (76 aa), denumit *ubiquitina*. Se crede că enzimele de ubiquitinare sunt capabile să identifice o serie de modificări post-translaționale, cum ar fi fosforilări, defosforilări, glicozilări. *Proteasomii imuni* conțin, printre altele, unitățile LMP-2 și LMP-7. Astfel de proteasomi sunt capabili să hidrolizeze legăturile peptidice consecutive reziduurilor bazice și/sau hidrofobe (inclusiv proteine nou sintetizate, înainte chiar ca translația să se fi încheiat), dar ubiquitinarea proteinelor nu mai este necesară. Nu întâmplător, peptidele care se leagă la MHC I se termină aproape exclusiv cu reziduuri hidrofobice sau bazice. Deoarece proteasomii imuni clivează preferențial anumite secvențe, aceasta ajută la selectarea peptidelor care vor fi încărcate în fiecare alelă MHC I.

Peptidele rezultate din procesare și care trebuie transportate în reticul sunt chaperonate de către proteine de șoc termic hsp70, hsp90 și hsp110. Apoi, transportul peptidelor în RER este asigurat de *TAP* (transporters associated with antigen processing – un heterodimer format din TAP 1 și TAP 2), printr-un proces care necesită hidroliza ATP. Se pare că TAP poate transloca din citosol în reticulul endoplasmatic mai mult de 20.000 de peptide/min/celulă și astfel furnizează suficiente peptide moleculelor MHC I nascente, acestea fiind produse la o rată de 10-100/min. În RER, moleculele MHC I sunt unite la TAP prin intermediul unui chaperon numit *tapasină*, iar această asociere fizică va facilita capturarea unui peptid transportat de către TAP, înainte ca acest peptid să fie expus mediului din RER. Ca urmare a legării peptidului, molecula MHC I devine stabilă, se poate disocia de chaperoni și poate ieși din RER. Prin intermediul complexul Golgi, se îndreaptă spre suprafața celulară unde va prezenta peptidul limfocitelor Tc (CTL) (figura 17.13).

b) Genele de clasă II sunt grupate în câteva subregiuni denumite – *HLA-DP*, *HLA-DQ*, *HLA-DR*, ce conțin gene care codifică pentru lanțurile α și β ale moleculelor MHC II clasice (figura 17.11)În general, fiecare astfel de subregiune conține perechi de gene α și β, chiar dacă unele sunt pseudogene. În schimb, în subregiunea DR, a fost evidențiată prezența mai multor gene pentru lanțul β și o singură genă α, ceea ce dă posibilitatea asocierii lanțului α cu diverse lanțuri β.

În afară de genele HLA II clasice, au fost identificate *gene HLA II non-clasice* (*HLA-DM, HLA-DN, HLA-DO*). Funcția acestor produși este în general de reglare a moleculelor clasice. Tot în regiunea HLA II a fost identificată prezența genelor *LMP2* și *LMP7*, care codifică două dintre subunitățile proteasomului, și a genelor *TAP1* și *TAP2* ce codifică subunități ale transportorului de peptide din citosol în RER.

Moleculele HLA de clasă II sunt heterodimeri glicoproteici membranari, alcătuiți dintr-un lanț α și un lanț β. Lanțurile sunt asociate între ele necovalent, fiecare fiind alcătuit din câte 2 domenii extracelulare (α_1 și α_2, β_1 și β_2), un domeniu transmembranar și unul intracelular. Domeniile α_1 și β_1 reprezintă domeniile *variabile* ale

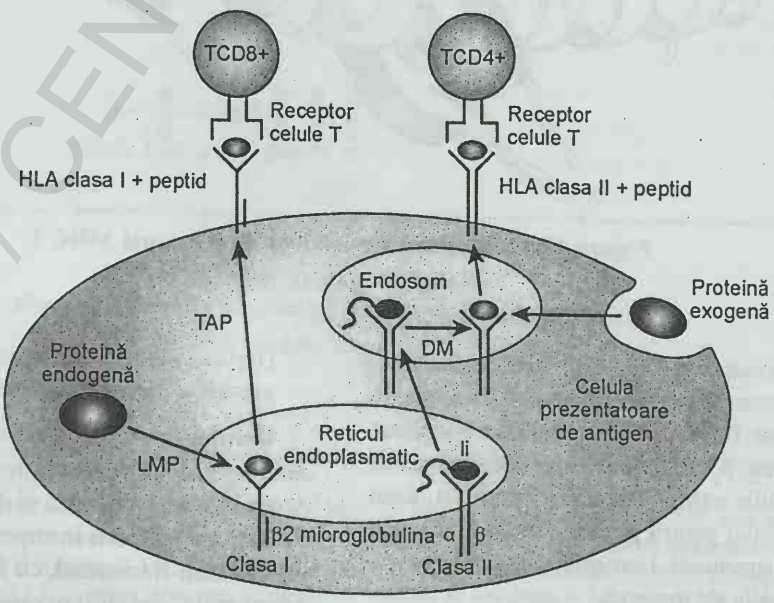


Figura 17.13. Rolul moleculelor HLA I și HLA II în prezentarea antigenelor limfocitelor T
(după Nussbaum *et al.*, 2001)

BCU IASI / CENTRALA UNIVERSITARA

moleculei şi, împreună, participă la formarea unei cupe asemănătoare celei a moleculei HLA I. MHC II este exprimat în mod constitutiv pe celulele prezentatoare de antigen (APC) profesionale (celule dendritice, limfocite B, macrofage). Alte celule pot exprima MHC II în condiţii fiziologice sau patologice. Celulele epiteliului timic, celulele Langerhans, dar şi limfocitele T umane activate cu Ag sau mitogeni exprima MHC II în mod normal. Pe alte celule însă, expresia MHC II poate fi indusă: celulele epiteliale din intestin, trahee, limbă, amigdale, epiglotă, tubuli renali proximali, uretră, epididim, celulele placentare, endoteliu vascular, fibroblaşti dermici, keratinocite, melanocite, astrocite, celule Schwann, celule sinoviale, celule epiteliale tiroidiene (aşa cum se întâmplă în tiroidita Hashimoto), celulele pancreatice b (diabet zaharat).

Moleculele de clasă II sunt asamblate în reticulul endoplasmic şi apoi eliberate în endosomi împreună cu lanţul invariant (Ii – CD74), o proteină care ocupă cupa MHC II, ceea ce oferă protecţie moleculei MHC II şi, totodată, împiedică accesul peptidelor citosolice în cupă. Lanţul Ii pare de asemenea responsabil pentru ieşirea MHC II din reticulul endoplasmatic şi orientarea din reţeaua trans-Golgi către calea endocitică. Activitatea proteolitică din această cale va conduce la degradarea lanţului Ii, în cupa MHC II rămânând un peptid scurt denumit *CLIP* (class II – associated invariant chain peptide). CLIP ocupă fizic cupa, ceea ce va preveni o legare prematură a vreunui peptid Ag-nic, dar şi degradarea MHC II. HLA-DM, prezent în aceeaşi veziculă, joacă un rol foarte important în înlăturarea CLIP, catalizând schimbul dintre CLIP şi un peptid antigenic produs în endosomi prin digestia antigenelor exogene. Odată peptidul legat, complexul este transportat la suprafaţa celulei, acolo unde pH-ul neutru permite obţinerea unei forme compacte, stabile.

c) Genele de clasă III. În ciuda faptului că din punct de vedere genomic aceste gene fac parte din complexul genic MHC, produşii codificaţi de aceste gene au structuri şi funcţii complet diferite. Unele gene codifică proteine serice precum *factori ai sistemului complement* (factorul B, proteinele complementului C2 şi C4); altele codifică *proteine de şoc termic* (hsp70), altele codifică *citokine* (factori de necroză tumorală – TNFα şi TNFβ – cunoscută şi sub numele de limfotoxină α); la acestea se adaugă gena pentru 21-hidroxilază (*CYP21A2*), o enzimă esenţială pentru sinteza glucocorticoizilor, deficienţa acesteia conducând la *hiperplazia congenitală de suprarenală,* precum şi gena *HFE* ce produce prin mutaţie, *hemocromatoza ereditară.*

2. Proprietăţile şi funcţiile sistemului HLA

a) Proprietăţile sistemului HLA

Caracteristicile distinctive ale sistemului HLA sunt reprezentate de:

- polimorfism,
- codominanţă,
- transmiterea strâns înlănţuită (în bloc, ca un haplotip) de la părinţi la descendenţi,
- asocierea preferenţială.

Poate cel mai remarcabil aspect al al genelor HLA este **polimorfismul** lor înalt, adică existenţa a multiple alele pentru un anumit locus.

Aceste alele diferă, la nivelul secvenţei ADN, cu procente cuprinse în medie între 5 şi 10% şi, ca urmare, produşii genelor exprimaţi de diferiţi indivizi prezintă diferenţe structurale. Nu întâmplător, aceste diferenţe se regăsesc în special la nivelul domeniilor variabile, implicate în formarea cupelor şi astfel în legarea antigenului. Sursa diversităţii moleculelor HLA este diferită de cea a moleculelor de imunoglobuline sau TCR, mecanismele care conduc la obţinerea polimorfismului MHC, a acestui număr impresionant de variante alelice pentru genele HLA, fiind dintre cele mai diverse: mutaţii punctiforme, recombinări genetice, conversii genice, *crossing-over* omolog, dar inegal etc.

Sistemul HLA posedă un număr absolut remarcabil de alele diferite pentru aproape fiecare dintre locii enumeraţi anterior. Cu siguranţă este cel mai polimorfic complex genetic cunoscut la vertebrate. Până în prezent, analiza moleculelor HLA I a revelat, de exemplu, existenţa a câteva sute de alele pentru HLA-B. Moleculele HLA II sunt la fel de polimorfice, pentru gena care codifică lanţul β al HLA-DRB1 fiind raportate, de asemenea, câteva sute de variante alelice. Frecvenţa acestor alele diferă în funcţie de grupul etnic şi localizarea geografică a populaţiei. Cu siguranţă că cifrele pe care le avem astăzi la dispoziţie cu privire la polimorfismul genelor HLA reprezintă subestimări şi, odată cu trecerea pe scară largă la secvenţierea genelor, vor fi caracterizate multe alte alele.

Conform calculelor bazate pe cifrele pe care le avem la dispoziţie în prezent, numărul de combinaţii astfel posibile (diversitatea teoretică) depăşeşte 10^{12}. Acest calcul se bazează însă doar pe numărul incomplet de alele cunoscut până în prezent, astfel că diversitatea teoretică reală este mult mai mare. Pe de altă parte însă, diversitatea observată în realitate este mai mică. Faptul că nu se manifestă o distribuţie chiar întâmplătoare şi că anumite combinaţii de alele apar mai frecvent decât ar rezulta din calculul probabilităţilor a condus la noţiunea de asociere preferenţială

sau „*dezechilibru de înlănțuire*". De exemplu, frecvența cu care gena HLA-A1 apare în populația caucaziană este de 16%, iar a genei B8 este de 10%. Conform calculului teoretic, frecvența asocierii HLA-A1 cu HLA-B8 ar trebui să fie de 16% x 10%, adică de 1,6% ; totuși, datorită dezechilibrului, frecvența A1 + B8 este de 8,8%.

În ciuda acestui fenomen, care restrânge diversitatea teoretică, numărul de combinații posibile care pot rezulta ca urmare a exprimării diverselor alele HLA rămâne enorm, ceea ce face să nu existe două persoane identice (excepție făcând gemenii monozigoți); genele HLA reprezintă un „*veritabil buletin molecular de identitate*". Astfel, moleculele HLA reprezintă una dintre cele mai serioase bariere în calea efectuării unui alotransplant (între membri diferiți ai aceleiași specii).

Toate genele HLA, indiferent de varianta alelică, sunt *dominante*, iar exprimarea lor este *codominantă*, deci ambele gene alele de pe cromosomii omologi se exprimă pe suprafața celulelor. Deși acest tip de exprimare este cel normal, este important de subliniat că exprimarea simultană a alelelor prezente pe cromozomii omologi reprezintă o importantă diferență față de excluzia alelică ce apare în cazul genelor Ig și ale TCR. Mai mult decât atât, unele celule (cum ar fi limfocitele de exemplu) încearcă să exprime cât mai multe tipuri de molecule HLA, astfel că, per ansamblul organismului, avem de a face cu un set complet de molecule, expresie a tuturor genelor din complexul major de histocompatibilitate.

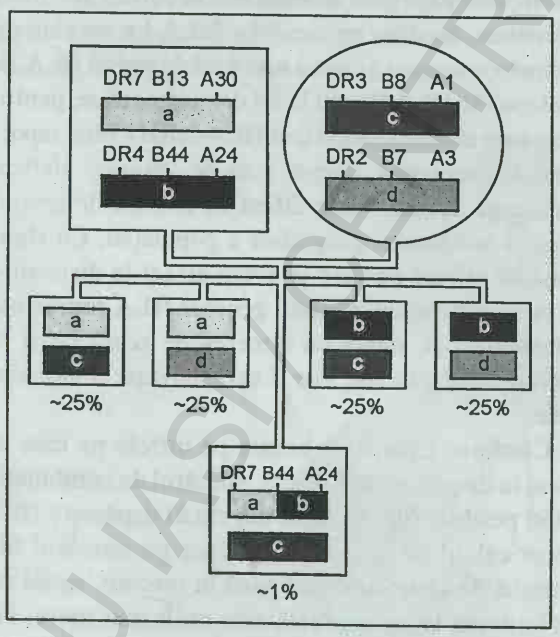


Figura 17.14. Transmiterea în bloc a haplotipurilor MHC

Există situații rare, când un părinte poate transmite un haplotip recombinant copilului, aspect deosebit de important în cadrul diagnosticului de paternitate.

O altă proprietate a genelor ce alcătuiesc sistemul HLA este *înlănțuirea strânsă și transmiterea în bloc* de la părinți la copii a genelor alele ce formează pe fiecare cromozom 6 un anumit **haplotip**. Notând haplotipurile parentale, corespunzătoare celor doi cromozomi 6 omologi, cu **a b** și **c d** la copii sunt posibile următoarele combinații genotipice (fiecare părinte transmite, prin gameți, unul din cele două haplotipuri): **a c**, **a d**, **b c** și **b d** – fiecare cu o probabilitate de 25%. De aici rezultă că fiecare dintre copii va fi semi identic cu fiecare dintre părinți, iar în fratrie există probabilitatea teoretică ca frații și surorile să fie: semi identici (50%), identici (25%), diferiți (25%) (figura 17.14).

b) Funcțiile sistemului HLA

Moleculele HLA au fost identificate inițial ca urmare a rolului lor în respingerea grefelor. Acestea erau rejetate în primul rând datorită răspunsului limfocitelor T față de moleculele HLA străine. În ciuda contextului în care au fost descoperite, *funcția primordială a moleculelor HLA este aceea de a prezenta antigenele limfocitelor T.*

Chiar dacă sunt implicate în legarea antigenului, interacțiunea HLA-peptid antigenic nu este una strict specifică, așa cum este cea dintre Ig/TCR și antigen. S-a demonstrat, de exemplu, că două variante alelice diferite ale aceleiași molecule HLA I pot prezenta mai mult de 2.000 de peptide diferite; în plus, fiecare tip de moleculă HLA leagă un set diferit de peptide. În această manieră pot fi prezentate simultan pe suprafața celulei respective un număr enorm de peptide antigenice diferite și activate astfel un număr corespunzător de limfocite T diferite.

Posibilitatea sau imposibilitatea prezentării unui anumit antigen dictează astfel răspunsul față de acesta și, ca urmare, rezistența sau susceptibilitatea la boală. Deci diferite haplotipuri HLA au o eficiență diferită în inducția răspunsului imun la diferiți antigeni. Aceasta ar explica de ce *puterea de apărare a fiecărui organism la diferite agresiuni ale patogenilor este diferită de la o persoană la alta.*

Prin interacțiunea directă cu TCR și moleculele co-receptor (CD4 și CD8), moleculele HLA reprezintă o componentă importantă în *activarea limfocitelor T* și astfel în *reglarea și desfășurarea răspunsului imun.* Celulele prezentatoare de antigen captează, procesează și apoi prezintă peptide antigenice pe suprafața lor, asociate moleculelor HLA de clasă II. Limfocitele Th recunosc antigenul prezentat în aceasta manieră și se activează, ceea ce conduce la proliferarea și diferențierea lor. Ele vor fi astfel capabile să stimuleze limfocitele Tc (care recunosc la rândul lor antigenul prezentat împreună cu moleculele HLA de clasă I),

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

limfocitele B (care se vor putea diferenția în plasmocite și secreta anticorpi), dar și alte celule aparținând apărării nespecifice.

S-a demonstrat că moleculele HLA pot fi implicate în lumea animală și într-o serie de fenomene ne-imunologice (diferențierea structurală, atingerea greutății corporale optime, producția de ouă, alegerea partenerului etc.), multe din aceste fenomene având o bază hormonală. Moleculele MHC de clasă I ar putea funcționa și ca niște componente ale unor receptori hormonali sau factori de creștere.

Sistemul HLA a intrat practic în atenția cercetătorilor odată cu primele experimente de transplant, dar această intervenție este una pe care sistemul imun nu a avut-o în vedere. Genele și moleculele HLA au fost concepute, așa cum menționam anterior, în scopul prezentării antigenelor și activării limfocitelor T. Diversitatea acestui sistem a fost creată nu pentru a ridica o barieră în calea transplantării, ci pentru a oferi cât mai multe șanse de supraviețuire în fața agresiunii patogenilor organismului respectiv. Dacă astăzi alotransplantul a devenit o manevră terapeutică uzuală, cu un grad relativ ridicat de succes, este și pentru că s-a ajuns la un anumit nivel de înțelegere al sistemului imun. Astfel, suntem perfect conștienți că nu putem realiza o potrivire perfectă între un donator și un primitor, iar potrivirea (*match*) dintre cei doi vizează doar anumite alele și molecule HLA. În plus, chiar și în condițiile în care terapia imunosupresoare a crescut semnificativ supraviețuirea organului transplantat, riscul rejetul acut nu a fost încă eliminat.

3. Sistemul HLA și asocierea cu diverse afecțiuni

Diverse studii statistice au reușit să demonstreze că anumite afecțiuni autoimune, boli determinate ca o consecință a infecțiilor virale sau bacteriene, afecțiuni ale sistemului complement sau afecțiuni alergice par să fie asociate mai frecvent cu anumite alele MHC. Această asociere dintre alelele HLA și o anumită boală a condus la noțiunea de „*risc relativ*", sintagmă care semnifică probabilitatea ca persoana prezentând o anumită alelă (sau constelație de alele) HLA să dezvolte afecțiunea respectivă[20]. Un risc relativ de 1 înseamnă că alela HLA vizată este prezentă, la individul afectat, cu aceeași frecvență ca în populația generală. Un risc relativ (substanțial) mai mare decât 1 avertizează însă asupra potențialei susceptibilități a individului de a dezvolta o anumită afecțiune. Astfel, o persoană care posedă alela HLA-B27 prezintă o probabilitate de 90 de ori mai mare să dezvolte spondilită anchilozantă decât o persoană care nu are această alelă (tabelul 17.1).

Un risc relativ înseamnă o vulnerabilitate crescută în fața bolii. Sistemul HLA nu este însă nici pe departe singurul care intervine în determinismul unei afecțiuni (tabel 17.2). Cu siguranță că cel mai elocvent exemplu este dat de situațiile în care doar unul dintre gemenii monozigoți dezvoltă boala. Asocierea unei alele HLA particulare cu o anumită boală este cu atât mai dificilă în contextul dezechilibrului de înlănțuire și trebuie interpretată cu precauție.

Explicațiile pentru asocierea dintre HLA și o serie de boli sunt multiple. În ceea ce privește bolile infecțioase și afecțiunile autoimune, cea mai plauzibilă ipoteză se referă la capacitatea sau incapacitatea unui anumit produs MHC de a prezenta sau nu un antigen particular. Reducerea polimorfismului HLA în cadrul unui grup populațional antrenează predispoziția către boli infecțioase. Pe de altă parte, moleculele MHC însele pot servi drept ținte/receptori pentru agenți patogeni virali sau bacterieni. De asemenea, un mecanism de evaziune a imunității din partea agenților patogeni implică mutații care conduc la codificarea unor epitopi majori ce mimează moleculele MHC ale organismului infectat. În aceste condiții polimorfismul MHC va face ca măcar o serie de indivizi ai speciei respective să poată supraviețui agresiunilor și va permite selecția în continuare a anumitor alele.

În cazul *hemocromatozei ereditare* și *hiperplaziei suprarenaliene congenitale* este vorba mai curând de o înlănțuire genetică între alele patogene și anumite alele HLA, determinată de situarea acestor gene de boală în regiunea HLA. La aceasta se poate adăuga un dezechilibru de înlănțuire (de exemplu, între hemocromatoză și HLA-A3; vezi caseta 3.1). În alte afecțiuni nu este clar dacă asocierea cu o anumită genă HLA este determinată de variații în răspunsul imun sau de un dezechilibru de înlănțuire. De exemplu asocierea dintre narcolepsie și HLA-DQ6 sau asocierea dintre diabetul zaharat insulino-dependent și HLA-DQB_1 sau HLA-DRB_1 (vezi capitolul 14.B.3).

20. Riscul relativ (RR) se calculează după următoarea formulă: RR=ad/bc, unde a = proporția de pacienți care prezintă alela respectivă, b = proporția de pacienți care nu prezintă alela respectivă, c = frecvența alelei în grupul de control, f = frecvența absenței alelei în grupul de control.

Tabel 17.1. Exemple de asocieri ale genelor HLA cu o serie de afecțiuni

Se remarcă faptul că majoritatea sunt boli autoimune.

Boala	Alelele HLA asociate	Riscul relativ
Spondilita anchilozantă	B27	90
Sindromul Goodpasture	DR2	16
Enteropatia glutenică	DR3	12
Hemocromatoza ereditară	A3 B14 A3/B14	9,3 2,3 90
Diabetul zaharat tipul 1	DR3/DR4 DQ8	20 14
Scleroza multiplă	DR2	5
Miastenia gravis	DR3	10
Narcolepsia	DR2	130
Artrita reactivă (*Yersinia*, *Salmonella*, *Gonococcus*)	B27	18
Sindrom Reiter	B27	37
Artrita reumatoidă	DR4	10
Sindromul Sjögren	Dw3	6
Lupusul eritematos diseminat	DR3	5
Tiroidita subacută	B35	14
Psoriazisul vulgar	Cw6	7
Boala Graves	DR3	4
Hiperplazia congenitală suprarenaliană (deficiența de 21-hidroxilază)	Bw47	80-140
Pemfigusul vulgar	DR4	24
Carcinomul cervical cu celule scuamoase	DQw3	7

Tabel 17.2. Asocierea autoimunităților cu gene non-HLA

(adaptat după Mak și Saunders, 2006)

Afecțiune	Gene Non-HLA
Spondilita anchilozantă	Gene necunoscute din regiunile 1p, 2q, 6p, 9q, 10q, 16q, 19q
Crohn Disease	CARD15, transportori de cationi
Sindrom Guillan-Berre	FCγR II, TNF
Boala Graves	CTLA-4
Tiroidita Hashimoto	CTLA-4
Diabet zaharat insulino-dependent	Insulina, CTLA-4, IL-12 p40
Psoriazis	Gene de pe CRS 17 ce conțin un situs Runx de legare
Artrita reumatoidă	IL-1β, IL-1R, MBL, TNFR2, ICAM-1, IFNγ, diverși FcR, IL-6 (forma juvenilă) Gene de pe CRS 17 ce conțin un situs Runx de legare
Sclerodermie	C4, C2, Factor B, hsp70, TNF, fibrilina
Lupus Eritematos Diseminat	CR1, hsp70, FcγR II, FcγR III, IL-6, IL-10, TNF, TNFR2, PD-1, gene de pe cromozomul 2 ce conțin un situs Runx de legare, C1, C4, C2 (5% din cazuri)
Sindrom Sjogren	Promotor-ul IL-10

BCUAS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

E. Imunodeficiențele

Eficiența apărării organismului împotriva agenților patogeni şi ai produşilor toxici ai acestora depinde de funcționarea normală a sistemului imun. De aceea, lipsa sau funcționarea anormală a componentelor acestui sistem, fie că aparțin imunității specifice sau nespecifice, conduce la o serie întreagă de afecțiuni, denumite generic imunodeficiențe. O primă clasificare poate împărți imunodeficiențele în *primare* (când deficiența este chiar cauza bolii) şi *secundare* (care apar ca o consecință a altor afecțiuni). Imunodeficiențele primare pot fi, la rândul lor, *ereditare* şi *dobândite*. Imunodeficiențele pot fi de asemenea definite în funcție de componentul afectat: deficiențe ale limfocitelor B, ale limfocitelor T, deficiențe B şi T combinate, ale fagocitelor sau procesului de fagocitoză şi ale sistemului complement. Indiferent în care categorie se încadrează, principala consecință este reprezentată de o susceptibilitate crescută față de o serie de agenți patogeni (dintre care se remarcă microorganismele oportuniste) şi apariția de infecții a căror severitate poate pune chiar în pericol viața pacientului. Alte consecințe sunt reprezentate de frecvența crescută a apariției unor afecțiuni maligne, sau de posibilitatea declanşării unor afecțiuni autoimune.

Imunodeficiențele limfocitelor B afectează (cantitativ sau calitativ) producția de anticorpi şi conduc la infecții recurente cu bacterii piogene, ca şi la o sensibilitate crescută față de anumite virusuri. Originea imunodeficiențelor ereditare se regăseşte fie în cursul maturării limfocitului B, fie în cursul răspunsului limfocitului B față de un antigen. Dată fiind dependența limfocitelor B de ajutorul limfocitelor T helper, anormalități ale acestora din urmă vor conduce, de asemenea, la afectarea secreției de anticorpi.

Imunodeficiențele limfocitelor T vor afecta în primul rând imunitatea celulară, dar, aşa cum menționam, imunitatea umorală va avea de asemenea de suferit. Va apărea astfel o susceptibilitate crescută la infecțiile cu virusuri, fungi, protozoare şi bacterii intracelulare. Aceste imunodeficiențe pot fi rezultatul unei tulburări de maturare a limfocitelor T ca urmare a unei aplazii/hipoplazii timice, sau ale unor anormalități ale activării şi funcționării limfocitelor în urma activării antigenice.

Afectarea ambelor tipuri de limfocite conduce la SCID (*Severe Combined Immune Defficiency* – Imunodeficiențe Severe Combinate). Acesta este un grup heterogen de imunodeficiențe, în care indivizii sunt practic susceptibili la infecții cu oricare patogen. Sunt descrise 3 subgrupuri:

- T- B+ în care este afectată fie gena de pe cromozomul X care codifică lanțul γ al receptorilor pentru interleukinele-2, 4, 7, 9 şi 15, fie gena care codifică Jak 3 tirozin-kinaza, o moleculă responsabilă pentru transducerea intracelulară a semnalului recepționat de aceşti receptori (transmitere recesiv autozomală);
- T- B- în care se manifestă fie o deficiență în ADA (adenosin dezaminază)[21], fie deficiențe ale recombinazelor RAG;
- T+ B+ în care limfocitele nu se pot activa în special ca urmare a absenței moleculelor MHC (sindromul limfocitelor goale).

Principala imunodeficiență care afectează fagocitele este *boala granulomatoasă cronică*, denumită astfel ca urmare a formării de leziuni inflamatorii cronice. Celulele sunt capabile să internalizeze patogenul, dar nu reuşesc să îl ucidă intracelular. Afecțiunea poate fi transmisă autozomal recesiv, dar cel mai frecvent este implicată o genă de pe cromozomul X care codifică o subunitate a citocromului b. La acest nivel are loc asamblarea NADPH oxidazei, responsabilă pentru activarea mecanismelor oxigen dependente de ucidere intracelulară.

Deficiențele sistemului complement (care pot afecta atât căile de activare, cât şi sistemul reglator) sunt caracterizate printr-o susceptibilitate crescută la infecțiile cu piogeni şi bacterii intracelulare, dar şi prin tendința de persistență a complexelor imune circulante şi, implicit, de apariție a unor autoimunități sistemice.

Imunodeficiențele pe care le-am menționat pot fi încadrate totodată şi în categoria bolilor care apar ca o consecință a afectării unei singure gene. Aceste afecțiuni sunt numeroase (tabel 17.3) şi suntem conştienți că nu avem încă o imagine completă asupra acestora, chiar dacă şi în cazul unor boli infecțioase (hepatita B şi C, tuberculoză, HIV ş.a.) au început să fie conturate asocieri cu anumite gene HLA. Sistemul imun reprezintă însă un angrenaj extrem de complex, astfel încât un anumit defect genetic poate conduce la efecte surprinzătoare, cu grade foarte diferite de severitate. Cu atât mai mult, tratarea unor astfel de boli va depinde tot mai mult de izolarea şi caracterizarea genelor care stau la baza unor astfel de afecțiuni.

21. ADA este o enzimă folosită pentru degradarea purinelor. În absența ei, celulele acumulează cantități excesive de adenozină şi deoxiadenozină, toxice în mod particular pentru limfocite. O altă enzimă, PNP (purin nucleotid fosforilaza) degradează guanozina la inozină. Absența sa conduce la acumularea excesivă de metaboliți ai guanozinei (GMP, GDP şi GTP) şi ai deoxiguanozinei (dGMP, dGDP şi dGTP), care, ca şi metaboliții adenozinei, sunt toxici pentru limfocite.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 17.3. Exemple de imunodeficiențe monogenice

(după Nussbaum, McInnes, Willard, 2001)

Boala	*Gena*	*Localizare cromozomială*	*Defectul genic/patogenia bolii*	*Numărul L_T*	*Numărul L_B*	*Nivelul Ig*	*OMIM*
Defecte combinate ale limfocitelor T și B							
Imunodeficiența combinată severă (SCID) legată de X	*IL2RG*	Xq13.1	Defectul lanțului ă al receptorului pentru IL-2	Redus	Normal sau crescut	Redus	# 300400
SCID autozomal recesivă tipul T-negativ/B-pozitiv	*JAK3*	19p13.1	Defecte ale semnalizării intracelulare pe calea JAK	Redus	Normal sau crescut	Redus	# 600802
Deficiența adenozin dezaminazei	*ADA*	20q13.11	Tulburare selectivă la nivelul limfocitelor a metabolismului purinic	Scade progresiv	Scade progresiv	Redus	# 102700
Deficiența nucleozid fosforilazei	*NP*	14q13.1	Tulburarea metabolismului purinic la nivelul limfocitelor	Scade progresiv	Normal	Normal sau redus	* 164050
Sindromul limfocitelor goale tip II	*MHC2TA* *RFX5*	16p13 1q21.1-q21.3	Mutații ale factorilor de transcripție ce reglează expresia genelor MHCII	CD4 reduse	Normal	Normal sau redus	# 209920
Imunodeficiența dată de defectul selectiv al limfocitelor T	*ZAP70*	2q12	Blocarea maturării limfocitelor T	CD8 reduse	Normal	Normal	+ 176947
Imunodeficiența combinată severă fără limfocite B	*RAG1* *RAG2*	11p13	Blocarea dezvoltării limfocitelor; absența rearanjamentelor receptorilor L_T și L_B	Redus	Absent	Absent	# 601457
Sindromul Omenn	*RAG1* *RAG2*	11p13	Rearanjamente deficitare ale receptorilor L_T si L_B	Redus	Redus	Redus	# 603554
Imunodeficiența cu hiper IgM, tip 1	*TNFSF5*	Xq25-q26	Defecte ale ligandului CD40 exprimat pe suprafața L_T; blocarea comutării isotipului L_B	Normal	Normal	IgM crescut; IgA, IgG redus	# 308230
Sindromul DiGeorge	*MULTIPLE*	22q11.2	Defecte ale dezvoltării timusului; anomalii cardiace, faciale, paratiroidiene	Normal sau redus	Normal	Normal sau redus	# 188400
Deficite ale sintezei anticorpilor							
Agamaglobulinemia legată de X (sindromul Bruton)	*BTK*	Xq21.3-q22	Defecte ale tirozin kinazei Bruton specifice L_B	Normal	Foarte redus	Redus sau absent	* 300300
Agamaglobulinemia autozomal recesivă	*IGHM*	14q32.3	Defecte ale expresiei lanțului μ pe suprafața celulelor B	Normal	Absent	Absent	* 147020
Boli ale fagocitelor							
Boala granulomatoasă cronică	*CYBB* *CYBA* *NCF1* *NCF2*	Xp21.1 16q24.1 7q11.23 1q25	Defecte ale enzimelor sistemului citocrom oxidazei care conduc la anomalii ale fagocitozei	Normal	Normal	Normal	# 306400 # 233690 # 233700 # 233710
Deficiența adeziunii leucocitelor	*CD18*	21q22.3	Defecte ale CD18 sau alte molecule de pe suprafața leucocitelor necesare pentru motilitate, aderență și endocitoză	Normal	Normal	Normal	# 116920
Sindromul Chediak-Higashi	*CHS1*	1q42-q44	Defecte ale asamblării lizozomilor ce conduc la granule citoplasmatice gigantice	Normal	Normal	Normal	# 214500

BCUIASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Boala	*Gena*	*Localizare cromozomială*	*Defectul genic/patogenia bolii*	*Numărul L_T*	*Numărul L_B*	*Nivelul Ig*	*OMIM*
Defecte combinate ale limfocitelor T şi B							
Boli ale sistemului complement							
Deficienţe ale unor componente individuale	multiple	multiple	Deficienţele C1, C2, C4, C3 sunt asociate cu boli autoimune şi infecţii piogene; deficienţele C3, C5-9 şi properdinei asociază infecţii cu *Neisseria*	Normal	Normal	Normal	multiple
Alte sindroame distincte cu defecte imune							
Sindromul Wiskott-Aldrich	WAS	Xp11.23	Defecte ale citoscheletului ce determină eczemă, trombocitopenie, infecţii recurente	Normal sau redus	Normal	Uneori IgM redus	# 301000
Ataxia telangiectazia	ATM	11q22-q23	Defecte ale reparării ADN; ataxie, cancere, neurodegenerare progresivă, radiosensibilitate	Normal	Normal	Normal	# 208900
Sindromul Bloom	BLM	15q26.1	Defecte ale reparării ADN; neurodegenerare, cancere, radiosensibilitate	Normal	Normal	Normal	# 210900
Sindromul limfoproliferativ autoimun tip IA	TNFRSF6	10q24.1	Tulburări ale apoptozei L_T şi L_B mediată de FAS; limfoadenopatie, autoimunitate	Creşterea L_T CD4-/ CD8-	Crescut	Crescut	# 601859

CASETA 17.1

O clasificare recentă a imunodeficienţelor primare

Imunodeficienţele primare (IDP) sunt afecţiuni genetice în care o componentă a sistemului lipseşte sau nu funcţionează corect; deşi individual sunt rare, în ansamblul lor IDP afectează circa 1:500 nou-născuţi. Prima clasificarea a IPD a fost realizată de un comitet internaţional de experţi ai OMS în 1970; de atunci periodic această clasificare este revizuită şi, în 2005, Uniunea Internaţională a Societăţilor de Imunologie a recunoscut opt clase de IPD, care totalizează peste 120 de entităţi.

1. *Imunodeficienţele combinate ale celulelor T şi B sunt afecţiuni în care sunt afectate ambele tipuri de limfocite T şi B implicate în imunitatea adaptativă; din cele 13 afecţiuni cele mai importante sunt T-/B+ SCID şi T-/B- SCID.*
2. *Deficienţele de anticorpi se caracterizează prin absenţa sau scăderea numărului sau funcţionalităţii limfocitelor B ce conduc la perturbarea producţiei de anticorpi.*
3. *Sindroame bine definite – care scapă unei clasificări formale, dar sunt recunoscute prin anumite manifestări clinice sau imunologice; de exemplu, sindromul Wiskott-Aldrich, sindromul DiGeorge, defecte de repararea a ADN (ataxia-telangiectazia, sindromul Nijmegen, sindromul Bloom, sindromul Wiskott-Aldrich etc.).*
4. *Boli cu dereglare imună: imunodeficienţe cu hipopigmentaţie sau albinism, sindromul limfoproliferativ legat de X, limfohistiocitozele hemofagocitare familiale etc.*
5. *Afecţiuni ale fagocitelor (monocite/macroface sau granulocite) dintre care boala granulomatoasă cronică (forme autozomale sau legate de X) este cea mai cunoscută.*
6. *Deficienţe imunitare înnăscute sunt defecte ale sistemului imun înnăscutce formează prima linie de apărare împotriva antigenelor; multe dintre ele sunt asociate cu afecţiuni cutanate (de exemplu, displazie ectodermală hipohidrotică sau epidermodisplazia veruciformă).*
7. *Boli autoinflamatoare ce duc la o inflamaţie excesivă, multe se manifestă ca sindroame cu febră periodică (de exemplu, febra mediteraneană familială).*

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8. Deficienţa ale complemtului ce apar prin lipsa unei proteine din grupul complement; predispun la infecţii piogene şi boli autoimune (de exemplu, artrita reumatoidă, sindromul lupus-like, vasculite, polimiozite, glomerulonefrite menbranoproliferative etc); semnalăm în această categorie şi angiedemul ereditar (prin deficienţa inhibitorului-C1).

Actuala clasificare a IDP ţine cont de spectrul manifestărilor clinic şi imunologice ale IPD şi exclude clasificarea unei deficienţe în mai multe categorii de IPD.

Bibliografie specifică selectivă

1. Abbas AB, Lichtman AH, Pober JS, WB. *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders, Philadelphia, 2000.
2. Benjamini E, Coico R, Sunshine G. *Immunology, a short course*. Wiley-Liss, New York, 2000.
3. Fugmann SD, Lee, AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. *The RAG proteins and V(D)J Recombination: Complexes, Ends and Transposition*. Annu Rev Immunol 2000; 18:495-527.
4. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M. *Molecular Mechanism of Class Switch and Recombination: Linkage with somatic Hypermutation*. Annu Rev Immunol 2002, 20:165-196.
5. Janeway CA Jr, Travers P, Walport MJ, Capra JD. *Immunobiology*. Current Biology Ltd, Elsevier, New York, 1999.
6. Goldsby R, Kindt TJ, Osbirne B. *Kuby's Immunology*. Freemanand Co, New York, 2000.
7. Nemazee D. *Receptor Selection in B and T Lymphocytes*. Annu Rev Immunol 2000, 18:19-51.
8. Netea M, van der Meer JW. *Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors*. N Engl J Med 2011; 364:60-70.
9. Paul WE. *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York, 1993.
10. Puck JM. *Primary immunodeficiency diseases*. JAMA 1997; 278:1835-1841.
11. Roitt I. *Essential Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1998.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 18

GENETICA BOLII CANCEROASE

Cancerul este un termen generic care defineşte o gamă largă de boli caracterizate prin *alterarea proceselor de creştere şi proliferare celulară.*

Cancerul reprezintă una dintre cele mai frecvente cauze de deces (conform OMS, în 2007, în întreaga lume au fost înregistrate 7.9 milioane decese cauzate de cancer, adică 13% din total). În ţările industrializate cancerul ocupă locul doi între cauzele de deces după bolile cardiovasculare (circa 25%). Odată cu creşterea duratei medii de viaţă, se estimează că peste jumătate din populaţie ar putea fi diagnosticată cu o formă de cancer într-un anumit moment al vieţii.

Proliferarea celulară necontrolată are ca rezultat formarea unei mase celulare numite **tumoră** sau *neoplasm* (în greacă *neo* = nou, *plasein* = a forma). Procesul de formare a unei tumori este denumit *tumorigeneză*. Neoplasmele *maligne* invadează ţesuturile învecinate şi adesea *metastazează* (diseminează) colonizând teritorii aflate la distanţă, trăsături care disting cancerele de tumorile *benigne*.

> Tumorile sunt clasificate în funcţie de ţesuturile din care se formează, principalele tipuri fiind: *carcinoamele* (tumori derivate din celulele epiteliale) – categoria cea mai frecventă, *sarcoamele* (derivate din ţesuturile conjunctive), *limfoamele* (cu originea în ţesuturile limfatice), *leucemiile* (ce afectează organele hematopoietice), *cancerele cu celule germinale* (derivate din celule pluripotente localizate în gonade) şi *blastoamele* (cancere cu originea în ţesuturi embrionare, frecvente la copii).

Celulele care formează o tumoră au originea într-*o singură celulă precursoare*, care se multiplică activ şi formează o **clonă**. Celulele din clona neoplazică în formare *acumulează o serie de modificări genetice şi epigenetice* care conduc la schimbări în activitatea unor gene şi, datorită acestora, la modificări fenotipice. Celulele sunt supuse selecţiei şi, în final, o populaţie a celulelor clonale acumulează suficiente modificări fenotipice pentru ca acel teritoriu să devină un cancer. Trăsăturile definitorii ale populaţiilor de celule maligne sunt:

- autosuficienţa factorilor de creştere;
- insensibilitatea la semnalele care blochează creşterea;
- capacitatea de proliferare nelimitată (imortalitate celulară);
- sustragerea de sub controlul mecanismelor apoptotice;
- capacitatea de invazie a ţesuturilor vecine;
- angiogeneză proprie susţinută;
- metastazare la distanţă.

Cauzele care conduc la apariţia cancerelor sunt numeroase şi variate şi includ *factorii de mediu, predispoziţia genetică şi vârsta.* Aceşti factori determină sau contribuie la transformarea celulelor normale în celule canceroase prin perturbarea unui spectru larg de căi fiziologice. Această complexitate a mecanismelor fiziopatologice este principala piedică în dezvoltarea unor mijloace terapeutice specifice şi eficiente.

Factorii de mediu sunt consideraţi a fi principala cauză în dezvoltarea cancerelor (aproximativ 75% din cazuri). Exemple de factori de mediu includ: substanţele carcinogene (de exemplu, fumul de ţigară – responsabil de o treime din toate cancerele din ţările dezvoltate şi circa 20% în întreaga lume), radiaţiile ionizante şi ultraviolete, infecţiile virale (virusuri papilloma, hepatitis B şi C, virusul Ebstein-Barr etc. – responsabile de 15% din toate cancerele la nivel mondial) şi bacteriene (*Helicobacter pylori* în cancerul gastric) etc. Indiferent de etiologie însă, toate cancerele apar ca urmare a unor evenimente genetice şi epigenetice. Majoritatea acestor evenimente se produc în cursul vieţii individului, la nivelul celulelor somatice. În absenţa reparării lor, aceste *mutaţii somatice* sau *dobândite* se vor transmite la celulele fiice, conducând la formarea unei clone. Deoarece apar la nivelul celulelor somatice, asemenea mutaţii nu pot fi însă transmise în succesiunea generaţiilor de organisme; ele nu sunt ereditare.

Uneori, anumite mutaţii care predispun la apariţia cancerului se produc la nivelul celulelor germinale. *Mutaţiile germinale* se transmit de la o generaţie la alta şi au ca rezultat agregarea familială a unor cancere specifice.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Indiferent dacă un cancer apare spontan la un singur individ sau se produce la mai multe persoane dintr-o familie, ca un caracter ereditar – *cancerul este considerat o boală genetică* deoarece inițierea și dezvoltarea unei tumori implică producerea în cascadă a unor mutații multiple, în diferite gene care controlează proliferarea celulară, repararea ADN, ciclul mitotic și moartea celulară.

A. Clase de gene implicate în dezvoltarea cancerului

Cancerul se dezvoltă ca urmare a mutațiilor genelor care controlează proliferarea și moartea celulară. Aceste gene pot fi clasificate în patru categorii majore: *oncogene*, *gene supresoare de tumori*[1], *gene de stabilitate* și *gene microARN*.

- **Oncogenele** reprezintă variantele mutante (activate) ale unei clase de gene normale numite **protooncogene**. Activarea acestor gene este rezultatul unor mutații *cu câștig de funcție*. Oncogenele au efect *dominant* la nivel celular; ca atare, o singură alelă mutantă (activată) este suficientă pentru modificarea fenotipului celular.
- **Genele supresoare de tumori** sunt gene care blochează dezvoltarea neoplaziilor maligne prin reglarea creșterii și proliferării celulare. Mutații *cu pierderea funcției* acestor gene conduc la proliferare și creștere celulară necontrolate și la apoptoză ineficientă. Genele supresoare de tumori se manifestă ca gene *recesive* la nivel celular, pentru convertirea fenotipului fiind necesară pierderea sau mutația ambelor alele.
- **Genele de stabilitate** includ genele implicate în repararea leziunilor ADN care apar în cursul replicării normale a ADN sau a mutațiilor induse de expunerea la mutageni și deci în *menținerea stabilității genomului*. Mutațiile acestor gene conduc la creșterea globală a frecvenței mutațiilor, inclusiv a celor de la nivelul oncogenelor și genelor supresoare de tumori. Similar genelor supresoare de tumori, genele de stabilitate sunt *recesive*, pentru producerea unui efect fiziologic fiind necesară inactivarea ambelor alele.
- **Genele microARN** (ARNmi), spre deosebire de celelalte categorii de gene implicate în cancer, nu codifică proteine, ci molecule de ARN monocatenare cu lungimea de 21-23 nucleotide. MicroARN-urile sunt implicate în reglarea post-transcripțională a expresiei genice, acționând fie prin blocarea translației ARNmesager în proteine, fie prin degradarea lui (vezi capitolul 4). Funcțional, genele microARN pot fi atât gene supresoare de tumori, dacă au ca ținte critice anumite oncogene, cât și oncogene, dacă inhibă expresia unor gene supresoare de tumori.

1. Oncogenele

Primele date despre existența oncogenelor au fost obținute la sfârșitul anilor '60 prin studiul unor *virusuri* capabile să inducă dezvoltarea unor tumori la diverse specii animale (tumorigeneză). Ulterior s-a demonstrat că o singură genă din structura acestor virusuri poate fi responsabilă de inițierea tumorigenezei. Primul exemplu a fost gena *src* a virusului sarcomului avian Rous[2]. Asemenea gene au fost denumite **oncogene virale** (*v-onc*).

> Au fost identificate și virusuri oncogenice umane. Printre acestea se numără atât virusuri ARN (precum virusul HTLV1 implicat în etiologia leucemiilor adulte cu celule T sau virusul hepatitic tip C care determină cancere hepatocelulare), cât și virusuri cu genom ADN (cum sunt, de exemplu, virusul *Papilloma* – HPV – implicat în producerea cancerelor tactului genital, virusul hepatitic tip B – hepatocarcinoame, virusul Epstein-Barr – limfomul Burkitt, virusul HV40 – mezotelioame sau virusul herpetic tip 8 – sarcomul Kaposi).

Gene înrudite ca secvență cu cele ale retrovirusurilor oncogene au fost însă identificate și în ADN celulelor umane normale. Aceste gene îndeplinesc funcții în controlul creșterii și diferențierii celulare, iar *activarea* lor necorespunzătoare, ca moment și ca loc, poate conduce la apariția cancerului. Genele celulare normale au fost denumite **protooncogene**, iar variantele lor activate – **oncogene celulare** (*c-onc*).

La sfârșitul anilor '70 a fost dezvoltată o modalitate complet diferită de identificare a oncogenelor, bazată pe metode de *transformare celulară*. Asemenea experimente au permis introducerea prin **transfecție**[3] a unor fragmente de ADN provenite din celule canceroase

1. Termneul „gene supresoare de tumori" este traducerea denumirii din limba engleză „*tumor suppressor gene*"; aceste gene nu suprimă o tumoră ci numai creșterea tumorală.
2. Denumirea oncogenelor identificate prin studiul virusurilor oncogenice a fost bazată pe numele acestora. De exemplu, SRC este o oncogenă a virusului sarcomului Rous (Rous sarcoma virus), SIS o oncogenă a virusului sarcomului simian (Simian sarcoma virus), RAS este virusul sarcomului șobolanilor (rat sarcoma virus) și așa mai departe.
3. Transfecția reprezintă introducerea unei gene într-o celulă, permițând celulei transfectate să sintetizeze proteina corespunzătoare.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 18.1. Exemple de oncogene activate în cancerele umane

Oncogena	Localizarea cromozomială	Funcția proteinei codificate
ABL	9q34.1	tirozin kinază citoplasmatică
AKT1	14q32.32	serin-treonin kinază
BCL2	18q21.3	proteină integrală din membrana mitocondrială externă
CCND1	11q13	ciclina D1 implicată în controlul ciclului celular
EGFR (ERBB1)	7p12.3-p12.1	receptorul pentru factorul de creştere epidermal
ERBB2 (HER2/neu)	17q21.1	receptor membranar tirozin kinazic înrudit cu EGFR
MDM2	12q14.3-q15	reglator al activității proteinei p53
MET	7q31	receptor transmembranar pentru factorul de creştere hepatocitar (HGF)
MOS	8q11	serin-treonin kinază
MYC	8q24.1	factor de transcripție
MYCN	2p24.1	factor de transcripție
MYCL1	1p34.3	factor de transcripție
PDGFB	22q13.1	subunitatea ß a factorului de creştere derivat din plachete
PIM1	6p21.2	protein kinază
HRAS	11p15.5	proteina G citoplasmatică
KRAS2	12p12.1	proteina G citoplasmatică
NRAS	1p13.2	proteina G citoplasmatică
RAF1	3p25	MAP kinaz-kinaz-kinază (MAP3K)
RET	10q11.2	receptor transmembranar tirozin kinazic pentru factorul neurotrofic derivat din celulele gliale (GDNF) şi pentru neurtrofina
SRC	20q12-q13	tirozin-kinază

umane în culturi de celule non-neoplazice (linia de fibroblaste NIH-3T3). Prima genă care a indus transformarea tumorală prin această tehnică a fost o variantă mutantă a genei *HRAS*, o protooncogenă deja cunoscută din studiile retrovirale.

În sfârşit, o altă sursă de identificare a oncogenelor a fost analiza punctelor de rupere din *translocațiile cromozomiale* asociate constant cu anumite forme de cancer. Asemenea exemple sunt gena *MYC* în limfomul Burkitt[4] ori gena *ABL* în leucemia mieloidă cronică.

În prezent sunt cunoscute peste 100 oncogene (vezi tabelul 18.1). Oncogenele pot codifica diferite tipuri de proteine, clasificate pe baza activităților lor în mai multe categorii (figura 18.1):

(1) *Factori de creştere.* Activarea constitutivă a factorilor de creştere poate conduce la transformarea malignă a unor celule. De exemplu, factorul de creştere trombocitar tip beta (PDGFB – *platelet-derived growth factor β*), eliberat din trombocite în cursul coagulării celulare, este asemănător structural cu proteina codificată de oncogena *sis*. Nivelele crescute de PDGFB pot conduce la transformarea tumorală a fibroblastelor care exprimă pe membrană receptori PDGF.

(2) *Receptori ai factorilor de creştere.* Multe cancere prezintă mutații ale unor gene care codifică receptori ai unor factori de creştere. De exemplu, mutații care conduc la deleția domeniului de legare a ligandului din structura receptorului factorului de creştere epidermal (EGFR – *epidermal growth factor receptor*) conduc la activarea constitutivă a receptorului în absența ligandului şi la dereglarea câtorva căi de semnalizare intracelulară.

(3) *Proteine de semnalizare intracelulară.* Multe oncogene codifică proteine implicate în procese de semnalizare intracelulară. Acestea fac parte din două grupuri: protein-kinaze intracelulare şi proteine care cuplează GTP. Protein-kinazele intracelulare sunt de două tipuri: tirozin-kinaze (de exemplu, ABL, SRC) şi serin-treonin-kinaze (de exemplu, AKT1, RAF1, MOS, PIM1). Aceste oncogene sunt activate de regulă prin mutații punctiforme cu câştig de funcție.

(4) *Factori de transcripție.* Factorii de transcripție interacționează adeseori între ei pentru a induce activarea genelor pe care le controlează. De exemplu, factorul de transcripție Fos dimerizează cu factorul de transcripție Jun şi formează complexul AP1 care creşte expresia câtorva gene ce controlează diviziunea celulară. O serie de gene care codifică factori de creştere sunt adeseori activate în cancere în urma unor translocații cromozomiale (vezi mai jos).

(5) *Proteine de remodelare a cromatinei.* Modificarea gradului de condensare a cromatinei joacă un rol

4. Limfomul Burkitt este o forma agresivă de limfom cu origine în celulele tip B.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

esențial în controlul expresiei celulare. Un exemplu de astfel de proteină este MLLT1 care face parte dintr-un complex multiproteic ce remodelează nucleozomii. În leucemia limfocitară acută și leucemia mieloidă acută gena *MLLT11* (*ALL1*) poate fuziona cu alte peste 50 de gene, conducând la formarea unor proteine himeră ce dereglează activarea unor factori de transcripție sau receptori membranari.

(6) *Reglatori ai ciclului celular.* Gena *BCL2*, care este implicată în inițierea majorității limfoamelor foliculare, codifică o proteină localizată în mitocondrii ce inhibă apoptoza. Un alt membru al acestei familii de proteine, BCL-XL este activat în multe alte cancere (pulmonare, leucemii limfocitare cronice).

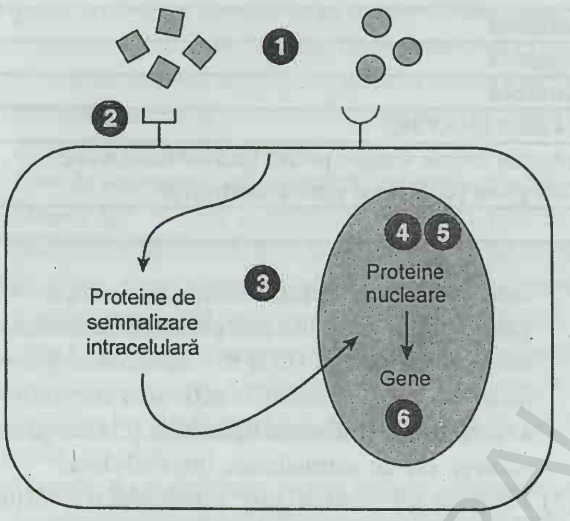


Figura 18.1. Tipuri de oncogene în funcție de nivelul celular unde acționează proteinele codificate de acestea

Fiind gene *dominante*, majoritatea mutațiilor responsabile de *activarea* oncogenelor apar la nivelul celulelor somatice. Mutațiile germinale sunt considerate a fi, foarte probabil, incompatibile cu dezvoltarea embrionară. Sunt cunoscute totuși câteva excepții în care mutațiile oncogenelor pot fi transmise de la o generație la alta, determinând forme ereditare de cancer (vezi tabelul 18.4). De exemplu:

- neoplaziile endocrine multiple tip 2 determinate de mutațiile oncogenei *RET* (vezi subcapitolul 18.D.1.1);
- cancerul renal papilar ereditar produs prin mutația oncogenei *MET*.

Activarea oncogenelor în celulele somatice se poate realiza prin mai multe mecanisme:

(1) *Activarea oncogenelor prin mutații punctiforme.* Acest mecanism este întâlnit în cazul unor oncogene care codifică receptori transmembranari sau proteine citoplasmatice (exemple: gena *RET*, familia genelor *RAS*, gena *BRAF* etc.). De pildă, genele *RAS* codifică proteine G (care leagă guanozin-trifosfat – GTP) implicate în căile de transducție ale semnalelor. Mutațiile punctiforme ale acestor gene la nivelul codonilor 12, 13 sau 61 conduc la sinteza unor proteine RAS anormale, capabile să semnalizeze continuu, chiar în absența GTP. Rezultatul este stimularea creșterii celulare și transformarea tumorală. Mutațiile *RAS* sunt observate în aproximativ 15% din toate cancerele (al doilea eveniment mutațional ca frecvență după mutația genei TP53). Mutațiile *KRAS* sunt frecvente în special în cancerele de plămân, colon și pancreas, în timp ce mutațiile *NRAS* apar în special în leucemia mieloidă acută și în sindromul mielodisplazic. În plus, genele RAS au fost documentate experimental a fi ținta mutațională a diverși carcinogeni.

(2) *Activarea oncogenelor prin translocații cromozomiale.* Uneori protooncogenele pot fi activate prin mutații cromozomiale, cel mai adesea translocații sau inversii. Au fost descrise numeroase asemenea translocații cu potențial activator al unor oncogene, în special în leucemii și limfoame, dar și în unele sarcoame sau cancere de prostată (vezi tabelul 18.2). Există două mecanisme prin care translocațiile cromozomiale pot conduce la activarea oncogenelor. În unele cazuri punctele de rupere sunt localizate la nivelul intronilor a două gene, rezultatul rearanjării cromozomiale fiind producerea unei proteine *himeră*, cu proprietăți noi (mutație cu câștig de funcție). Cel mai cunoscut exemplu este translocația între cromozomii 9 și 22 întâlnită în **leucemia mieloidă cronică** (vezi caseta 18.1). Alteori translocația activează o oncogenă prin plasarea acesteia în apropierea unui promotor puternic din structura altei gene. Un asemenea exemplu îl constituie activarea oncogenei *MYC* în limfomul Burkitt prin plasarea acesteia din poziția sa normală (8q24) în proximitatea promotorului genei pentru lanțul greu al imunoglobulinelor (14q32), foarte activ în celulele B care sintetizează Ig.

(3) *Activarea oncogenelor prin amplificare genică.* Amplificarea genică este un fenomen care are ca rezultat producerea mai multor copii ale unor oncogene normale structural. Fenomenul este responsabil de activarea unor oncogene precum cele din clasa *MYC* și *ERB* (vezi subcapitolul 18.B).

(4) *Activarea oncogenelor prin pierderea expresiei unor gene microARN* (vezi mai jos).

(5) *Activarea oncogenelor prin hipometilarea regiunii promotor* (vezi mai jos).

(6) *Activarea oncogenelor prin inserție virală.* Retrovirusurile oncogene, ca de exemplu HTLV1,

BUCUREȘTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 18.1

Leucemia mieloidă cronică (LMC)

LMC este o boală caracterizată prin expansiunea clonală a celulelor stem hematopoietice transformate malign, ceea ce are drept rezultat o creştere a numărului celulelor mieloide, eritroide şi al plachetelor circulante. Transformarea celulelor circulante are loc ca rezultat al expresiei oncogenei himeră BCR-ABL.

Aproximativ 95% din pacienţii cu LMC au un cromozom Philadelphia, produs prin translocaţia t(9;22), iar restul au translocaţii complexe sau variante ale translocaţiei principale. Protooncogena ABL (Abelson) care codifică o tirozin kinază citoplasmatică este localizată pe cromozomul 9q34, iar gena BCR (breakpoint cluster region), ce codifică o fosfoproteină, este localizată pe cromozomul 22q11. În cursul formarii cromozomului Philadelphia gena ABL este ruptă la nivelul intronului 1, iar gena BCR cel mai adesea la nivelul intronului 11. În urma translocaţiei, la nivelul cromozomului 22 se formează gena himerică BCR-ABL alcătuită din exonii 1-11 ai genei BCR şi 2-11 ai genei ABL (vezi figura 18.2).

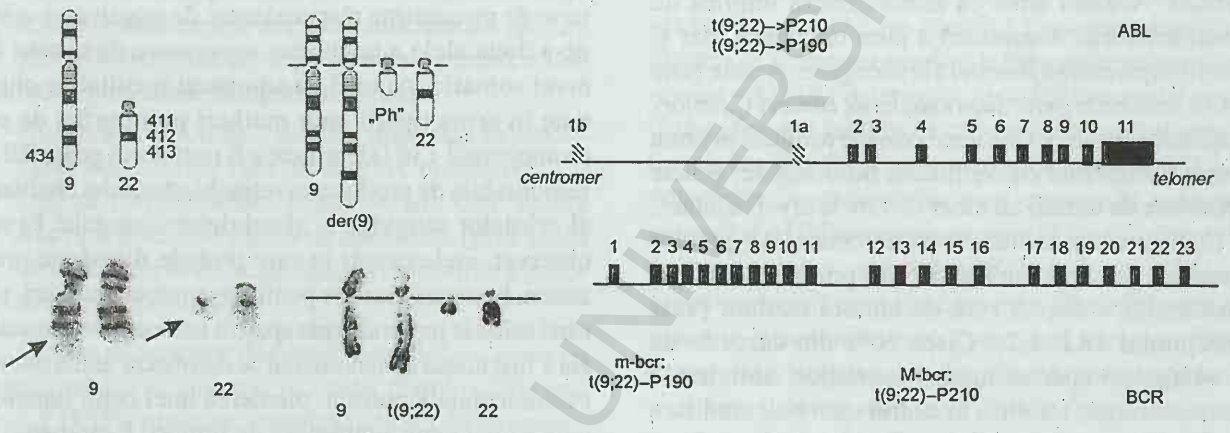


Figura 18.2. Translocaţia cromozomială t(9;22) care conduce la formarea cromozomului Philadelphia în LMC

Până în prezent nu se cunosc pe deplin funcţiile proteinelor BCR şi ABL. Proteina ABL se găseşte în citoplasmă, nucleu şi la nivelul membranei celulare şi intervine în multiple procese: controlul ciclului celular, semnalizarea integrinică şi dezvoltarea neurală. Proteina BCR este implicată în reglarea activităţii proteinelor din familia RAS şi a GTP-azelor RAC şi RHO. Spre deosebire de proteina ABL normală, proteina himerică are activitate tirozin kinazică constitutivă şi este localizată în principal în citoplasmă, unde se leagă intens de microfilamentele de actină. BCR-ABL fosforilează câteva substraturi citoplasmatice şi activează, probabil, o serie de cascade de semnalizare care controlează creşterea şi diferenţierea, precum şi adeziunea celulelor hematopoietice. Proliferarea necontrolată a celulelor stem hematopoietice conduce la eliberarea în circulaţie a unor celule imature, generând LMC.

În cursul progresiei LMC pot apărea modificări cromozomiale noi: trisomia 8 sau 19, i(17q) ori un al doilea cromozom Philadelphia. Apariţia acestor modificări are ca rezultat debutul crizei blastice.

Din punct de vedere clinic LMC se caracterizează prin evoluţie trifazică. Stadiul iniţial (sau cronic – faza indolentă) este caracterizat prin debut insidios cu manifestări constând în fatigabilitate, pierdere ponderală, splenomegalie minimă sau moderată. În timp, LMC evoluează spre o fază accelerată şi apoi spre criza blastică caracterizată prin leucocitoză progresivă, anemie, trombocitoză sau trombocitopenie, febră, accentuarea splenomegaliei şi leziuni osoase, cu evoluţie fatală rapidă.

*Metodele de tratament utilizate constau în transplantul medular sau administrarea de alpha interferon pentru cei fără donori compatibili. Administrarea altor citostatice are efecte numai pe scurte perioade de timp. Identificarea proteinei de fuziune BCR-ABL a condus la sinteza unui inhibitor specific (*Imatinib mesylate – Gleevec*) capabil să inducă moartea prin apoptoză exclusiv a celulelor care exprimă proteina anormală. Imatinib mesylate-ul este un medicament extrem de eficient şi a devenit rapid agentul terapeutic de elecţie pentru cazurile noi de LMC pentru care nu este indicat transplantul medular alogenic.*

îndeplinesc rolul unor vectori, transportând oncogene activate de la un organism la altul. Virusurile ADN acționează însă prin inserția în genomul gazdă a unor oncogene fără corespondent uman (ca, de pildă, gena pentru antigenul T al virusului SV40 – implicat în etiologia mezotelioamelor, ori antigenele E6 și E7 ale papilomavirusului tip 16 – implicat în producerea cancerelor de col uterin).

2. Genele supresoare de tumori

Experimentele de fuziune celulară au evidențiat faptul că fenotipul transformant al unei celule tumorale poate fi adesea corectat prin fuziunea celulei maligne cu una normală. Aceasta arată că tumorigeneza implică nu numai activarea dominantă a unor oncogene, dar și mutații *cu pierderea funcției* ale altor gene. Aceste gene au fost denumite ***gene supresoare de tumori*** („*tumor-suppressor genes*"). Deoarece celulele rezultate în urma acestor fuziuni sunt cu certitudine heterozigote, genele supresoare de tumori au efect *recesiv* la nivel celular[5].

Conceptele și metodele de cercetare ale genelor supresoare de tumori au fost definite prin studiul retinoblastomului, o formă rară de tumoră oculară (vezi subcapitolul 18.D.1.2). Circa 60% din cazurile de *retinoblastom* apar ca tumori sporadice, unilaterale și monocentrice, iar 40% în cadrul unei boli ereditare cu transmitere autozomal dominantă, neoplazia fiind adeseori bilaterală, multicentrică și cu debut mai timpuriu. Pentru a explica diferențele între cele două forme de boală, Knudson a propus în 1971 *ipoteza celor două evenimente* („*two hits*") necesare pentru transformarea unei celule normale într-o celulă tumorală. În cazurile de retinoblastom ereditar prima mutație este moștenită și prezentă la naștere în toate celulele organismului. A două mutație poate apărea la nivelul uneia sau mai multor celule retiniene, ceea ce explică frecvența relativ crescută a retinoblastoamelor bilaterale în forma familială de boală. De asemenea, moștenirea primei mutații explică debutul mai timpuriu al bolii.

Deși genele supresoare de tumori au efecte recesive la nivel celular, posibilitatea apariției unei mutații care să inactiveze a doua alelă în cel puțin o celulă a organismului este crescută și, ca urmare, retinoblastomul ereditar (ca și alte boli genetice produse de moștenirea unor asemenea mutații ale genelor supresoare de tumori) au un model de *transmitere dominantă*.

Cavenee și colaboratorii săi (1983) au demonstrat validitatea ipotezei lui Knudson și au evidențiat o serie de mecanisme răspunzătoare de inactivarea celei de-a doua alele a unei gene supresoare de tumori la nivel somatic. Autorii au comparat rezultatele obținute în urma tipării unor markeri polimorfici de pe cromozomul 13q (identificat a fi purtătorul genei *RB* – responsabilă de producerea retinoblastomului ereditar) al celulelor sangvine și al celulelor tumorale. Ei au observat unele cazuri în care probele din sânge prezentau heterozigozitate pentru asemenea markeri, pe când celulele tumorale erau aparent homozigote. Concluzia a fost aceea că fenomenul se datorează unuia dintre evenimentele Knudson: pierderea unei copii funcționale a unei gene supresoare de tumori. Fenomenul a fost denumit *pierderea heterozigozității* („*loss of heterozygosity*" – *LOH*).

Studiile citogenetice au permis identificarea mai multor mecanisme de inactivare a celei de-a două copii a unei gene supresoare de tumori în cancerele ereditare (figura 18.3):

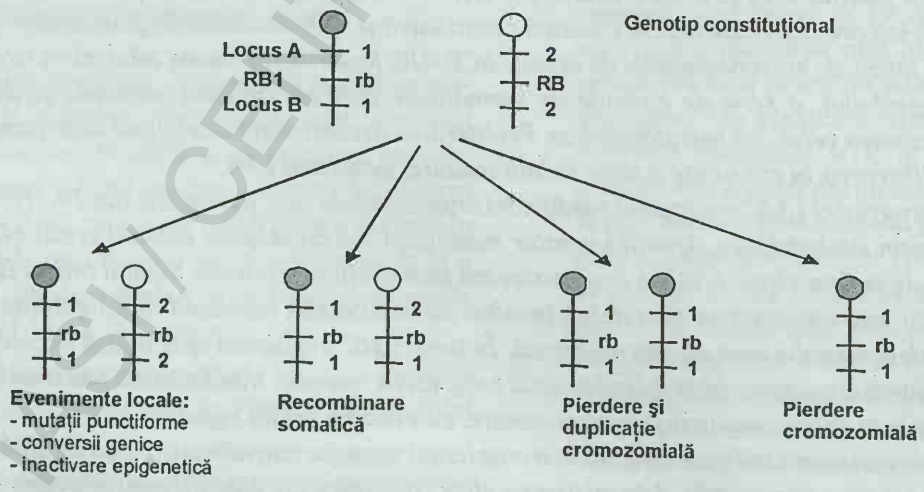


Figura 18.3. Mecanismele responsabile de inactivarea somatică a celei de-a doua alele ale genei supresoare de tumori RB1 la indivizii heterozigoți pentru o mutație germinală (cu rb este notată alela mutantă, iar cu RB alela normală)

5. Există totuși unele excepții în care mutația unei singure alele a unei gene supresoare de tumori poate conferi un avantaj de creștere celulei – fenomen de haploinsuficiență.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- deleții;
- recombinări somatice – prima dovadă a existenței acestui fenomen la nivelul celulelor somatice;
- pierderea unui cromozom;
- pierderea unui cromozom asociată cu duplicația cromozomului restant;
- creșterea expresiei unor gene microARN (vezi mai jos).

Pierderea heterozigozității este mecanismul cel mai frecvent de inactivare a celei de a doua alele în cancerele ereditare produse prin moștenirea unei gene supresoare de tumori mutante. Când pierderea heterozigozității nu este observată, cel de-al doilea eveniment mutațional este de regulă o *mutație punctiformă* sau inactivarea transcripțională a celei de-a doua alele printr-un *eveniment epigenetic* (vezi subcapitolul 18.C.2).

Identificarea genelor supresoare de tumori a fost realizată prin două categorii de studii:

- clonarea pozițională a genelor implicate în producerea unor forme rare de cancere ereditare;
- analiza fragmentelor cromozomiale care suferă frecvent deleții în cancerele sporadice (prin studii de pierdere a heterozigozității ori hibridizare genomică comparativă).

Genele supresoare de tumori codifică proteine cu funcții extrem de diverse: receptori membranari (precum PTCH); proteine citoplasmatice (de exemplu: APC, NF1); proteine nucleare (TP53, RB1, VHL, WT1 etc.). Aceste proteine sunt implicate direct în *controlul creșterii celulare* (de exemplu, inhibând mitoza sau promovând apoptoza). Ca urmare, funcția acestor gene (numite și *gene gatekeeper* – „portar") este critică pentru supresia tumorală. Mutațiile germinale ale tuturor acestor gene determină producerea unor boli genetice cu risc crescut de dezvoltare a cancerului care au o transmitere dominantă (vezi sindromul Li-Fraumeni – subcapitolul 18.D.1.3). Pe lângă implicarea lor în producerea unor cancere ereditare (vezi tabelul 18.4), genele supresoare de tumori sunt inactivate adesea și în cazul cancerelor sporadice. Inactivarea genei *TP53* este, de exemplu, cel mai frecvent eveniment mutațional întâlnit în cancerele sporadice (peste 50% dintre acestea, dar cu frecvențe mai mari în anumite localizări: cancerele mamare, colorectale, vezicale, pulmonare, cervicale etc.). Alte gene supresoare de tumori, frecvent inactivate în cancerele sporadice, sunt *APC* (în aproximativ 70% dintre cancerele colorectale) și *NF1* (în cancerele cu origine în celulele nervoase).

3. Genele de stabilitate

Genele de stabilitate codifică proteine implicate în *menținerea stabilității* genomului (au mai fost denumite *gene caretaker* – „îngrijitor"). Alterările acestor gene conduc la creșterea frecvenței mutațiilor la scara întregului genom, inclusiv a protooncogenelor și a genelor supresoare de tumori, precum și la apariția instabilității cromozomiale.

Toate căile de *reparare ale leziunilor ADN* (vezi capitolul 6) pot fi implicate în producerea cancerelor, dar consecințele sunt diverse. Astfel, alterările componentelor implicate în repararea leziunilor ADN prin excizia nucleotidelor (*nucleotide excision repair* – NER) sunt întâlnite în special în cancerele cutanate deoarece această cale este răspunzătoare de repararea leziunilor induse de radiațiile UV. Mutații ale genei *MUTYH*, implicată în repararea leziunilor ADN prin excizia bazei (*base excision repair* – BER) conduc la o formă atenuată de polipoză ereditară a colonului. Mutațiile genelor care codifică proteinele implicate în calea de reparare a erorilor de împerechere (*mismatch repair* – MMR) determină *instabilitatea microsateliților*, fenotip întâlnit în cancerul colorectal nonpolipozic ereditar (HNPCC – vezi subcapitolul 18.D.1.4). Alterările componentelor participante la repararea rupturilor ADN bicatenare ce apar în cursul proceselor de recombinare mitotică (*BRCA1, BLM, ATM*) au drept consecință creșterea frecvenței anomaliilor cromozomiale structurale, care constituie o caracteristică în special a neoplaziilor din sfera hematologică, dar și a unora dintre cancerele solide (cancere de sân, ovar, cerebrale). În sfârșit, alterările genei *O6 MGMT* care protejează împotriva mutațiilor A-G preced adeseori unele mutații punctiforme de acest tip întâlnite la nivelul genelor *RAS* în cancerele colorectale sau cu alte localizări.

Genele a căror dereglare poate conduce la *instabilitate cromozomială* controlează procese precum condensarea cromozomială, activitatea centromerelor (*CDK2*, *STK15*, *PLK1*), kinetocorilor (*APC*), ori a punctelor de control care previn separarea prematură a cromatidelor până ce cromozomii sunt corect aliniați la nivelul fusului de diviziune (securina, separina, MAD2L1, BUB1 – vezi subcapitolul 18.B).

Mutațiile genelor de stabilitate pot fi întâlnite atât în boli ereditare asociate cu risc crescut de dezvoltare a unor tumori (vezi tabelul 18.4), cât și în forme sporadice de boală. De exemplu, 15% dintre cancerele colorectale au mutații ale genelor MMR, în timp ce mutațiile *BRCA1* și *BRCA2* sunt întâlnite în unele cancere de sân și ovar sporadice.

Între genele supresoare de tumori și genele de stabilitate nu există o delimitare precisă. Astfel, genele *BRCA1* și *BRCA2* sunt gene supresoare de tumori prin activitatea lor de control a transcripției și gene de stabilitate prin intervenția lor în calea de reparare a rupturilor ADN bicatenare. De asemeni, gena *APC* pare a fi implicată și în controlul stabilității genomice.

4. Genele microARN (ARNmi)

Genele microARN (ARNmi) codifică molecule mici de ARN necodant (de circa 22 nucleotide) cu rol în reglarea post-transcripțională a expresiei genice. ARNmi se cuplează pe bază de complementaritate a secvenței cu regiunile netranslate 3' ale moleculelor ARNm țintă inducând degradarea ARNm sau inhibarea translației (vezi capitolul 4).

Primul exemplu de alterare a expresiei unei gene ARNmi în cancer a fost identificat în anul 2002 ca urmare a analizei câtorva cazuri de leucemie limfocitară cronică cu microdelеții sau translocații cromozomiale implicând 13q14. Analiza acestei regiuni cromozomiale a condus la identificarea *miR-15a* și *miR-16-1*, gene care sunt alterate în circa 70% din cazurile de leucemie limfocitară cronică. Studii ulterioare au condus la identificarea a numeroase alte gene ARNmi alterate în cancer (vezi tabelul 18.2).

Genele microARN pot funcționa atât ca gene supresoare de tumori, cât și ca oncogene, în funcție de genele lor țintă. În plus, aceeași genă ARNmi poate funcționa atât ca oncogenă, cât și ca genă supresoare de tumori în țesuturi diferite. De exemplu, *miR-221* și *miR-222* reglează expresia oncogenei *KIT* în celulele eritroblastice, acționând, în cazul leucemiei eritroblastice, ca o genă supresoare de tumori. În schimb, aceleași ARNmi pot controla activitatea unor gene supresoare de tumori precum *PTEN* sau *TIMP3* în diverse tumori solide, funcționând, drept urmare, ca oncogene.

Mecanismele de alterare a expresiei ARNmi în cancer sunt diverse.

- Translocații cromozomiale care conduc la ruperea unor ARNmi. Un exemplu este cel al genelor *miR-15a* și *miR-16-1* prezentat mai sus.
- Deleții cromozomiale. De exemplu, genele *miR-29a* și *miR-29b* localizate în regiunea cromozomială 7q32, suferă deleții frecvente în sindromul mielodisplazic și leucemia mieloidă acută.
- Mecanisme epigenetice, precum metilarea unor insule CpG din regiunea promotor. Un exemplu este cel al genei *miR-127* inactivată în cancerele de vezică urinară.
- Fenomene de amplificare genică care pot conduce la creșterea expresiei unor gene ARNmicro. De exemplu, *miR-155* localizată în regiunea cromozomială 21q23, este amplificată în diverse forme de limfoame cu celule B.

Tabelul 18.2. Exemple de gene ARNmi implicate în cancerele umane

ARNmi	Exemple de cancere	Gene țintă validate	Funcția ARNmi
miR-15a *miR-16-1*	Pierdute în leucemii limfoide cronice, cancere de prostată și mieloame multiple	*BCL2, WT1, RAB9B și MAGE83*	Gene supresoare de tumori
let-7 (a, b, c, d, e, f, g și i)	Pierdute în cancere de sân și plămân și în diverse neoplazii maligne hematopoietice	*RAS, MYC și HMGA2*	Gene supresoare de tumori
miR-29 (a, b și c)	Pierdute în forme agresive de leucemii limfoide cronice și leucemii mieloide acute, în sindromul mielodisplazic, cancere de sân și plămân și în colangiocarcinoame	*TCL1, MCL1, DNMT3A și DNMT3B*	Gene supresoare de tumori
miR-34	Pierdută în cancere de pancreas, colon, sân și cancere hepatice	*CDK4, CDK6, EZF3 și MET*	Genă supresoare de tumori
miR-145	Pierdută în cancere de sân	*ERG*	Genă supresoare de tumori
miR-221 *miR-222*	Pierdute în leucemia eritroblastică	*KIT*	Gene supresoare de tumori
miR-221 *miR-222*	Expresie crescută în forme agresive de leucemii limfoide cronice, cancere tiroidiene și hepatice	*P27, P57, PTEN și TIMP3*	Oncogene
miR-155	Expresie crescută în forme agresive de leucemii limfoide cronice, limfoame Burkitt, cancere pulmonare, de sân și colon	*MAF și SHIP1*	Oncogenă
miR-17-92	Expresie crescută în limfoame, cancere de sân, plămân, colon, stomac și pancreas	*E2F1, BIM și PTEN*	Oncogenă
miR-21	Expresie crescută în glioblastoame, leucemii mieloide acute, forme agresive de leucemii limfoide cronice, cancere de sân, colon, pancreas, plămân, prostată, ficat și stomac	*PTEN, PDCD4, TPM1 și TIMP3*	Oncogenă
miR-372 *miR-373*	Expresie crescută în cancere testiculare	*LATS2*	Oncogene

- Dereglarea unor gene ARNmi sub influența directă a unor factori de transcripție. De exemplu, oncogena MYC poate activa direct grupul de gene *miR-17-92* din regiunea cromozomială 13q31.3 în numeroase forme de cancer. La rândul lor, *miR-17-92* controlează PTEN, BIM şi E2F1.

Consecințele dereglării ARNmi în biología cancerului sunt diverse:

- reducerea nivelului proteinelor codificate de unele gene supresoare de tumori;
- creşterea nivelului proteinelor codificate de unele oncogene;
- alterarea activității unor componente implicate în reglarea mecanismelor epigenetice. De exemplu, gena *miR-29* de pe cromozomul 7q32 reglează direct ADN metiltrasferazele DNMT3A şi DNMT3B. Pierderea acestei gene are ca rezultat final hipermetilarea promotorilor unor gene supresoare de tumori.

B. Anomalii citogenetice în cancer

Anomaliile cromozomiale în cancere, echilibrate sau neechilibrate, sunt consecința instabilității genomice – caracteristică tuturor cancerelor. Odată cu îmbunătățirea metodelor de analiză citogenetică a devenit evident că toate tipurile de tumori prezintă anomalii cromozomiale. Sistemele OMS de clasificare a tumorilor utilizează în prezent o serie de asemenea anomalii cromozomiale în *definirea unor entități* specifice de boală. În plus, multe dintre ele au devenit *markeri prognostici*, în special în cancere hematologice, dar şi într-o serie de tumori solide. Caracterizarea moleculară a câtorva dintre aceste anomalii citogenetice a condus la dezvoltarea unor *tratamente specifice*.

1. Cauzele anomaliilor cromozomiale numerice

Cauzele anomaliilor cromozomiale în cancer sunt puțin înțelese. Studiile numeroaselor tipuri de leucemii au arătat că anumite expuneri profesionale sau la unii factori de mediu, ori tratamentele cu substanțe clastogene, pot induce anomalii cromozomiale. De exemplu, sindromul mielodisplazic sau leucemiile mieloide acute ce apar după tratamente cu agenți alchilanți sunt asociate frecvent cu deleții sau pierderi ale cromozomilor 5 sau 7 (ori ambii), în timp ce tratamentele cu inhibitori ai topoizomerazei de tip II sunt asociate cu anomalii cromozomiale echilibrate, cel mai adesea translocații ce implică gena *MLL* de pe cromozomul 11q23.

Studierea unor sindroame care se asociază cu un risc crescut de dezvoltare a cancerelor a permis înțelegerea unor detalii privind formarea anomaliilor cromozomiale. De exemplu, cazurile de sindroame mielodisplazice sau leucemie mieloidă acută care apar la pacienții cu anemie Fanconi prezintă de regulă anomalii cromozomiale neechilibrate complexe, considerate a fi rezultatul inactivării unor componente ale căilor moleculare implicate în *recunoaşterea şi repararea leziunilor ADN*. Apariția acestor anomalii cromozomiale complexe la pacienții cu anemie Fanconi pare a fi precedată de rearanjări cromozomiale subtile la nivelul benzii 3q26 care conduc la hiperexpresia genei *EVI1*. Acest eveniment genetic precoce ar putea creşte riscul de dezvoltare a cancerelor la aceşti pacienți purtători ai anomaliei.

O altă direcție majoră este identificarea *genelor care controlează aparatul mitotic*, ținte în generarea instabilității cromozomiale. Teoretic, genele implicate în producerea aneuploidiei pot controla condensarea cromozomilor, coeziunea cromatidelor surori, funcția şi structura kinetocorilor şi centrozomilor, ori dinamica microtubulilor.

- Un prim punct de control este reglarea activității *fusului de diviziune* care preîntâmpină separarea cromatidelor surori înainte de alinierea corespunzătoare a cromozomilor la nivelul fusului mitotic. Astfel, reducerea expresiei genei *MAD2L1* (cromozomul 4q27) – evidențiată în numeroase cancere mamare – este asociată cu instabilitate cromozomială tradusă prin aneuploidie. *MAD2L1* codifică o proteină care se ataşează la nivelul cromozomilor nefixați pe fibrele fusului de diviziune, inhibând activitatea complexului de promovare a anafazei. Mutațiile genelor *BUB1* şi *BUBR1*, care controlează activitatea fusului de diviziune, induc aneuploidie în unele cancere colorectale. În sfârşit, mutațiile securinei şi separinei, două proteine implicate în prevenirea separării premature a cromatidelor surori în cursul mitozei, pot conduce la instabilitate cromozomială.
- O a doua cauză potențială a aneuploidiei implică funcția anormală a *centrozomilor*. În multe tipuri de cancere umane, cum sunt cele de sân, plămân, colon sau prostată au fost evidențiate fusuri de diviziune multipolare sau un număr anormal de centrozomi. Până în prezent au fost identificate câteva gene care controlează activitatea centrozomilor şi anume cele care codifică kinazele CDK2, STK15 ori PLK1. Recent au fost aduse dovezi care susțin rolul proteinei APC în inducerea instabilității

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cromozomiale. Domeniul C-terminal al acestei proteine interacționează cu proteina EB1 asociată extremităților citoplasmatice ale microtubulilor fusului de diviziune. Complexul APC-EB1 pare a fi crucial pentru captarea kinetocorilor și stabilizarea interacțiunilor microtubuli-kinetocori.

În pofida acestor date, bazele moleculare ale instabilității cromozomiale rămân necunoscute în majoritatea cancerelor umane. Este evident caracterul heterogen al substratului acestui fenotip, cu numeroase gene, fiecare implicată într-o mică proporție a cancerelor.

2. Anomalii structurale echilibrate

Anomaliile cromozomiale echilibrate întâlnite în cancer includ *translocații reciproce* și *inversii*. Până nu demult, anomaliile cromozomiale echilibrate au fost considerate ca fiind specifice cancerelor hematologice sau tumorilor cu origine mezenchimală. Studii recente au identificat însă numeroase asemenea rearanjări cromozomiale specifice unor cancere cu origine epitelială (tabelul 18.3).

Anomaliile echilibrate apar de regulă precoce în evoluția bolii sau pot constitui chiar evenimentele care inițiază tumorigeneza. De exemplu, câteva translocații asociate cu leucemiile la copii pot să apară *in utero*, cu mult înainte de depistarea bolii. Anomaliile cromozomiale echilibrate pot conduce la formarea unor *gene himeră*, cu activități noi sau alterate, sau pot conduce doar la schimbări ale activității unor gene normale structural.

a. Anomalii cromozomiale cu formarea de gene himeră

Majoritatea anomaliilor cromozomiale structurale întâlnite în cancer au ca rezultat formarea unor **gene himeră**, prin fuziunea unor părți componente a două gene. Principalele grupe de gene care participă la formarea unor astfel de fuziuni sunt gene ce codifică tirozin kinaze și gene ce codifică factori de transcripție.

- Exemplul clasic de anomalie citogenetică al cărei rezultat îl constituie formarea unei gene himeră ce implică o *tirozin kinază* este cromozomul Philadelphia, întâlnit la aproape toți pacienții cu leucemie mieloidă cronică (vezi caseta 18.1), dar și la 20% dintre pacienții cu leucemie limfoblastică acută sau în cazuri rare de leucemii mieloide acute. Primul exemplu de fuziune genică într-un cancer epitelial implicând o tirozin kinază a fost descoperit în 2007, prin caracterizarea unei inversii criptice – inv(2)(p22-p21p23) – la peste 6% dintre pacienții cu cancere pulmonare din Japonia. Această inversie conduce la formarea unei gene himeră între *EML4* și gena *ALK* care codifică un receptor tirozin kinazic.
- Genele himeră care rezultă prin implicarea unor gene ce codifică *factori de transcripție* conduc la formarea unor proteine de fuziune cu activitate transcripțională anormală (tabelul 18.3). Un exemplu, întâlnit în circa 85% din cazurile de sarcoame Ewing, este translocația t(11;22)(q24.1-q24.3;q12.2) în care gena *FLJ1* de pe cromozomul 11, ce codifică un factor de transcripție din familia ETS, fuzionează cu gena *EWSR1* de pe cromozomul 22, care codifică un domeniu de transactivare foarte activ. Rezultatul este transcripția a numeroase gene a căror expresie anormală pare a fi necesară pentru creșterea tumorală.

b. Anomalii cromozomiale care conduc la dereglarea expresiei unor gene normale

Asemenea anomalii cromozomiale juxtapun elemente reglatorii cu specificitate tisulară (promotori sau secvențe activatoare) în imediata apropiere a unor

Tabelul 18.3. Anomalii cromozomiale echilibrate specifice unor cancere umane

Neoplazia	Anomalia cromozomială	Genele implicate
1. Anomalii cromozomiale cu formarea de gene himeră ce implică tirozin kinaze		
Leucemia mieloidă cronică	t(9;22)(q34.1;q11.23)	*BCR-ABL1*
Cancere pulmonare	inv(2)(p22-p21p23)	*EML4-ALK*
Mieloame multiple	t(4;14)(p16.3;q32.33)	*WHSC1-IGHG1*
Carcinoame papilare tiroidiene	t(1;10)(q21;q11)	*RET-NTRK1*
Carcinoame papilare tiroidiene	inv(10)(q11.2q21)	*RET-CCDC6*
2. Anomalii cromozomiale cu formarea de gene himeră ce implică factori de transcripție		
Leucemia acută promielocitară	t(15;17)(q22;q21)	*PML-RARA*
Sarcomul Ewing	t(11;22)(q24.1-q24.3;q12.2)	*EWSR1-FLI1*
Leucemia mieloidă acută	t(9;11)(p22;q23)	*MLL-MLLT3*
Cancere foliculare tiroidiene	t(2;3)(q12-q14;p25)	*PAX8-PPARG*
Leucemia mieloidă acută	inv(16)(p13.11q22.1)	*CBFB-MYH11*
3. Anomalii cromozomiale care dereglează expresia unor gene normale		
Limfomul Burkitt	t(8;14)(q24.21;q32.33)	*MYC-IGHG1*
Leucemia mieloidă acută	t(12;13)(p13;q12.3)	*ETV6-CDX2*
Limfoame foliculare	t(14;18)(q32.33;q21.3)	*IGHG1-BCL2*
Cancere de prostată	del(21)(q22.3q22.3)	*TMPRSS2-ERG*

proto-oncogene, rezultatul reprezentându-l anomaliile expresiei acestora. Un exemplu îl constituie translocația t(8;14)(q24.21;q32.33) asociată limfomului Burkitt, în care enhancer-ul genei *IGHG1* de pe cromozomul 14 ce codifică imunoglobuline este poziționat în apropierea genei *MYC* de pe cromozomul 8, ceea ce conduce la exprimarea constitutivă a celei din urmă. Primul exemplu de cancer non-limfoid conținând asemenea anomalii cromozomiale a fost cancerul de prostată. Cea mai frecventă anomalie – del(21)(q22.3q22.3) – este caracterizată prin fuziunea exonilor codanți ai genei *ERG* cu promotorul androgen-specific al genei *TMPRSS2* care este specifică prostatei.

3. Anomalii structurale neechilibrate

Anomaliile cromozomiale neechilibrate constau în câștiguri sau pierderi cu dimensiuni variate de material genetic, ce afectează cromozomi întregi, porțiuni de cromozomi, sau chiar o singură genă. Spre deosebire de rearanjările cromozomiale, în care genele a căror funcție este alterată pot fi identificate prin analiza punctelor de rupere, în majoritatea anomaliilor cromozomiale neechilibrate consecințele funcționale sunt necunoscute deoarece ele interesează adesea numeroase gene. Cu toate acestea, folosirea unor metode recente de analiză citogenetică a permis identificarea unor gene relevante pentru biologia cancerului la nivelul regiunilor cromozomiale afectate.

a. Anomalii cromozomiale cu câștig de material genetic

Anomaliile cromozomiale cu câștig de material genetic apărute ca urmare a unor evenimente de nedisjuncție cromozomială sau a translocațiilor cromozomiale neechilibrate au ca rezultat trizomii parțiale sau complete ce implică multiple gene. Numeroase asemenea anomalii cromozomiale ample sunt asociate cu tipuri specifice de cancer (tabelul 18.4). Studierea expresiei genelor implicate în astfel de anomalii a permis identificarea unor noi oncogene: *MITF* (3p14.2-p14.1) și *NEDD9* (6p25-p24) în melanoamele maligne sau *YAP1* (11q13) și *BIRC2* (11q22) în carcinoamele hepatocelulare.

O formă particulară de anomalii cromozomiale cu câștig de material genetic sunt *amplificările genice* (amp) care se evidențiază citogenetic sub forma *regiunilor colorate omogen* (*homogeneously stained regions* – HSR) ori a *cromozomilor minusculi* (*double minutes* – DMIN) (figura 18.4). Ampliconii rezultați conțin 0,5-10 megabaze ADN. Rezultatul îl reprezintă apariția a zeci sau sute de copii ale unei singure gene, în general protooncogene sau gene implicate în rezistența la agenți antitumorali. Amplificarea genică este un fenomen întâlnit în numeroase tipuri de cancere: colorectale, de sân, cancerele capului și gâtului sau în neuroblastoame. Fenomenul este asociat în special fazelor avansate de boală și indică un prognostic nefavorabil. Câteva exemple sunt amplificarea *NMYC* în 30% din neuroblastoamele avansate, amplificarea *ERBB2* sau *ESR1* (care codifică receptorul estrogenic tip 1) în circa 30% din cancerele mamare, ori amplificarea genei *NKX2-1* la 12% dintre pacienții cu cancere pulmonare. Identificarea amplificărilor genice a condus, în unele cazuri, la dezvoltarea unor metode noi de tratament. De exemplu, pacienții cu hiperexpresia *ERBB2* au un răspuns foarte bun la tratamentul cu anticorpul monoclonal trastuzumab, în timp ce amplificarea *ESR1* crește sensibilitatea la tratamentul cu tamoxifen.

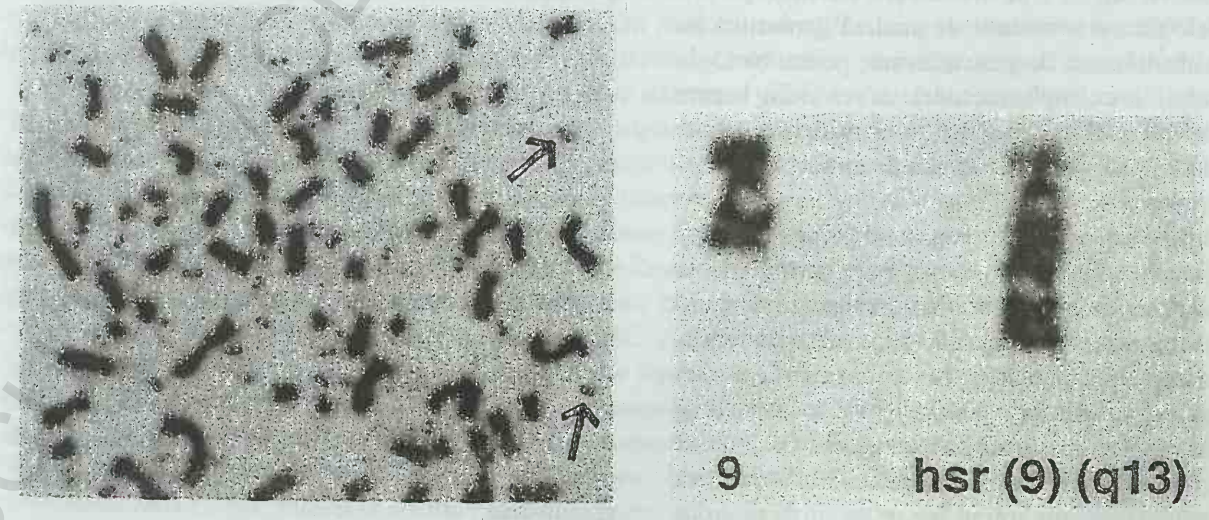


Figura 18.4. Aspectul citogenetic al celor două forme de amplificare genica: cromozomii minusculi (A) și regiunile colorate omogen (B)

Tabelul 18.4. Anomalii cromozomiale neechilibrate specifice unor cancere umane

Neoplazia	Anomalia cromozomială	Genele implicate
1. Anomalii cromozomiale cu câştig de material genetic		
Astrocitoame, glioblastoame	+7	?
Sindroame mielodisplazice	+8	?
Policitemia vera	+9p	*JAK2*
Leucemii limfocitare cronice	+12	?
Cancere testiculare	+12p	?
Neuroblastoame	amp(2)(p24.1)	*MYCN*
Cancere de sân	amp(6)(q25.1)	*ESR1*
Leucemia limfoblastică acută	dup(6)(q22-q23)	*MYB*
Cancere pulmonare	amp(14)(q13)	*NKX2-1*
Cancere de sân	amp(17)(q21.1)	*ERBB2*
2. Anomalii cromozomiale cu pierdere de material genetic		
Neuroblastoame	del(1p)	?
Sindroame mielodisplazice	del(5q)	?
Policitemia vera	del(20q)	?
Cancere renale	del(3)(p26-p25)	*VHL*
Cancere de colon	del(5)(q21-q22)	*APC*
Leucemia limfoblastică acută	del(9)(p13)	*PAX5*
Retinoblastoame	del(13)(q14.2)	*RB1*
Tumori Wilms	del(X)(q11.1)	*FAM123B*

b. Anomalii cromozomiale cu pierdere de material genetic

Spectrul acestor anomalii cromozomiale variază de la anomalii detectabile cu tehnicile citologice de rutină (monosomii parţiale sau complete), până la deleţii care implică o singură genă sau chiar deleţii intragenice care pot fi detectate doar prin tehnici cu rezoluţie spaţială crescută. Ca şi în cazul anomaliilor cromozomiale cu câştig de material genetic, multe dintre aceste anomalii sunt recurente şi specifice unor tipuri de cancere. Studierea prin metode clasice a unor asemenea pierderi genomice la scară largă a permis identificarea a numeroase gene supresoare de tumori precum *RB1* (13q14.2), *TP53* (17p13.1), *APC* (5q21q22), *NF1* (17q11.2) şi *PTEN* (10q23.3). Metodele recent introduse de analiză genomică au permis identificarea de gene relevante pentru biologia cancerului. De exemplu, metodele de *screening* bazate pe utilizarea ARNi au condus la identificarea genei *REST* (4q12) ca genă supresoare de tumori în cancerele de colon.

O dificultate aparte în analiza deleţiilor cromozomiale apare în cazul genelor care contribuie la procesul de tumorigeneză prin inactivarea unei singure alele. Asemenea gene supresoare de tumori haplo-insuficiente au putut fi identificate recent prin reducerea expresiei a numeroase gene candidat localizate în regiunile cromozomiale afectate de deleţii cu ajutorul ARNi. Un exemplu îl constituie gena *RPS14* ca genă responsabilă pentru sindromul 5q-, un subtip de sindrom mielodisplazic caracterizat prin deleţia a 1,5 Mb la nivelul cromozomului 5q32. De asemenea, deleţiile monoalelice pot inactiva complet gene supresoare de tumori localizate la nivelul cromozomului X. Acest mecanism a fost documentat recent prin identificarea genei supresoare de tumori *FAM123B* în interiorul deleţiei Xq11.1 la peste 20% din pacienţii cu tumori Wilms sporadice.

Pierderile cromozomiale asociate unor tipuri specifice de cancer pot să acţioneze prin inactivarea unor gene care codifică microARN. Aşa cum am menţionat mai sus, acest mecanism patogenic a fost evidenţiat pentru prima dată prin identificarea genelor *MIRN15A* şi *MIRN16-1* ce sunt localizate într-un segment de pe banda cromozomială 13q14.3 care este deletat la circa 50% dintre pacienţii cu leucemie limfocitară cronică. Ulterior s-a dovedit că cele două gene reglează negativ expresia proteinei antiapoptotice BCL2.

Cu toate progresele menţionate anterior, pentru multe pierderi genomice recurente, precum deleţiile 1p în neuroblastoame, deleţiile 3p în cancerele pulmonare şi deleţiile 7q în leucemiile mieloide, genele critice sunt încă necunoscute. Unele deleţii recurente au dovedit a avea însă o valoare deosebită în alegerea metodelor de tratament şi în aprecierea prognosticului, chiar şi în absenţa cunoaşterii genei critice. Exemple sunt deleţia 5q în leucemiile mieloide acute, deleţiile cromozomilor 11q, 13q şi 17p în leucemia limfocitară cronică şi deleţiile 1p şi 19q în oligodendroglioamele anaplastice.

BUCUREŞTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

C. Evoluția multistadială a cancerelor

Cu puține excepții, cancerele se dezvoltă dintr-o singură celulă și din urmașii acesteia. În cursul evoluției neoplazice clona acumulează o serie de modificări genetice și epigenetice care determină modificări fenotipice majore, în final luând naștere o populație de celule care scapă mecanismelor de control al creșterii și proliferării celulare, rezultatul fiind dezvoltarea unui cancer. În ultimii ani o serie de cercetări au probat existența așa-numitelor celule stem canceroase care stau la originea dezvoltării tumorilor maligne (vezi caseta 18.2).

Conform modelului Weinberg, transformarea unei celule normale într-o celulă canceroasă necesită 6-7 mutații succesive. Rata tipică a mutațiilor este însă 10^{-7} per genă și per celulă. Ca urmare, probabilitatea apariției a 7 mutații succesive într-o singură celulă din cele circa 10^{13} ale unui organism uman ar fi extrem de redusă: $10^{13} \times 10^{-42} = 10^{-29}$. Frecvența crescută a cancerelor poate fi explicată prin intervenția a două mecanisme:

- unele mutații exacerbează capacitatea de proliferare celulară, determinând nașterea unei populații ample de celule-țintă pentru mutațiile următoare (figura 18.5);
- unele alterări mutaționale determină instabilitatea întregului genom, crescând rata globală a mutațiilor.

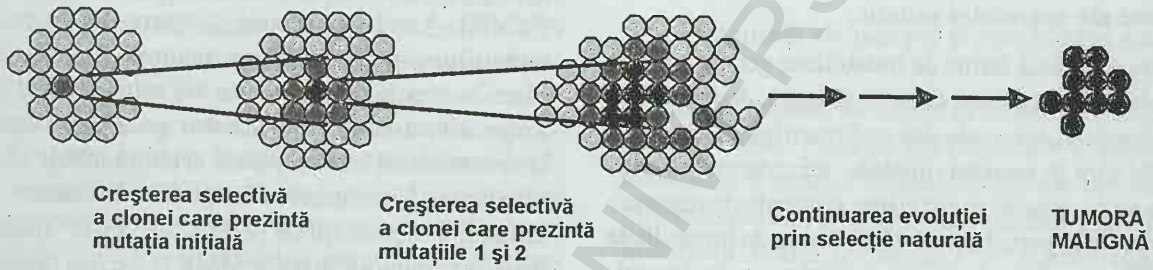


Figura 18.5. Evoluția multistadială a cancerelor
(după Strachan și Read, 1999)

CASETA 18.2

Celulele stem canceroase (CSC)

În conformitate cu ipoteza CSC, tumorile maligne sunt heterogene și doar celulele care inițiază cancerul au capacitatea de proliferare intensă dând naștere celulelor care formează tumora. Termenul CSC nu implică în mod obligatoriu faptul că toate cancerele își au originea într-o celulă stem normală. Dimpotrivă, în funcție de tipul tumoral, CSC pot fi celule stem, celule progenitoare sau celule diferențiate. Existența CSC are implicații considerabile întrucât se pare că acestea sunt rezistente la multe dintre tipurile convenționale de terapie folosite în prezent, ceea ce explică succesul încă redus în vindecarea cancerelor umane. În prezent se depun eforturi deosebite în două direcții majore: identificarea și caracterizarea CSC în diverse forme de cancere umane și dezvoltarea unor metode terapeutice care să țintească aceste celule.

*În anii '90 a fost demonstrată pentru prima dată existența CSC în leucemia mieloidă acută prin capacitatea acestora de a dezvolta fenocopii ale formei originale de leucemie atunci când au fost transplantate la șoareci cu imunodeficiență combinată severă. Cercetările similare întreprinse ulterior au făcut posibilă izolarea cu succes a CSC din numeroase tumori solide: cancere mamare, cerebrale, ovariene, de colon, ficat, pancreas sau melanoame maligne. Aceste celule sunt caracterizate prin prezența pe plasmalemă a unor markeri precum CD44, CD24, CD133, EPCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) și ABCB5 (ATP-*binding cassette sub-family *B* member 5*). Studiul acestor celule a permis caracterizarea principalelor căi de semnalizare implicate în reglarea capacității de auto-reînnoire a CSC: calea Wnt, calea Hedgehog (Hh) și calea Notch.*

Identificarea câtorva dintre markerii celulari de pe suprafața CSC, precum și a căilor de semnalizare implicate în auto-reînnoirea lor a condus deja la dezvoltarea unor noi modalități de terapie care încearcă să țintească aceste celule. Câteva exemple sunt: Adecatumumab (anticorp monoclonal împotriva EPCAM, folosit în prezent în trialuri clinice de fază II în tratamentul cancerelor de sân metastatice), H90 (anticorp monoclonal anti-CD44, folosit în trialuri preclinice pentru tratamentul leucemiilor acute mieloide) sau GDC-0449 (inhibitor al căii Hh, folosit în trialuri clinice de fază II în tratamentul carcinoamelor bazocelulare și al cancerelor de colon metastatice).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Exacerbarea capacității proliferative este consecința mutațiilor proto-oncogenelor ori a genelor supresoare de tumori, care permit:

- producerea autosuficientă a semnalelor necesare creșterii celulare;
- insensibilitatea la stimulii care se opun creșterii;
- sustragerea de sub controlul mecanismelor apoptozei;
- potențial replicativ nelimitat.

Instabilitatea genetică îmbracă cele două forme majore discutate anterior:

- instabilitatea microsateliților (MIN) determinată de mutații ale genelor implicate în repararea erorilor de împerechere;
- instabilitatea cromozomială (CIN) determinată de mutații ale genelor care controlează diverse componente ale aparatului mitotic.

Între cele două forme de instabilitate genetică există o corelație inversă, așa cum se observă, de exemplu, în cancerele colorectale sau endometriale. Cancerele cu MIN sunt în general diploide, iar cancerele aneuploide au în general mecanisme eficiente de reparare a erorilor de împerechere. Ambele forme de instabilitate genetică par a fi însă evenimente precoce în dezvoltarea tumorală.

În cadrul *evoluției multistadiale* a cancerelor unele evenimente sunt întâlnite aproape obligatoriu. Acestea sunt: imortalizarea (dobândirea capacității de proliferare nelimitată), apariția unor modificări epigenetice, mutații ale genomului mitocondrial, angiogeneza, rezistența în fața mecanismelor de moarte celulară programată, inflamația tumorală, reprogramarea metabolismului energetic, sustragerea la acțiunea mecanismelor imunologice de apărare antitumorală, invazia și metastazarea.

1. Imortalizarea celulelor tumorale

Celulele normale ale organismului uman pot suferi un număr limitat de diviziuni (limita Hayflick) după care intră într-un stadiu numit senescență replicativă. Acest fapt se datorează scurtării progresive a telomerelor, consecință a caracterului *asimetric* al replicării celor două catene ale ADN.

Telomerele umane sunt alcătuite dintr-o repetiție hexanucleotidică (TTAGGG)n. Fiecare replicare este asociată cu pierderea a aproximativ 35 perechi de baze ale acestei repetiții ADN. Pentru a evita acest fenomen și a permite numărul imens de diviziuni celulare necesar în cursul embriogenezei, organismul uman este prevăzut cu un sistem special de replicare a telomerelor care implică activitatea unui complex ARN-proteine numit *telomerază*. Principala componentă proteică a acestui complex este TERT (cromozomul 5p15.33). După perioada embrionară telomeraza este inactivată în majoritatea țesuturilor, rămânând activă numai în celulele cu replicare intensă, cum sunt cele din linia germinale.

S-a constatat, însă, că aproximativ 90% din cancerele umane au telomeraza reactivată. Reactivarea telomerazei poate fi indusă de către oncogena MYC sau de către oncogena E6 a *virusului Papilloma*. Reactivarea telomerazei nu este, totuși, suficientă pentru imortalizare, un alt eveniment necesar fiind inactivarea căii P16-RB-E2F1 de control a ciclului celular.

Aproximativ 10% din cancerele umane sunt însă capabile să-și mențină atât lungimea normală a telomerelor, cât și capacitatea de proliferare necontrolată în absența reactivării telomerazei. Recent s-a stabilit că această trăsătură poate fi rezultatul mutației genelor care intervin în *repararea erorilor de împerechere* (MMR). Aceste gene sunt necesare pentru evitarea mutațiilor și pentru represia recombinării omoloage. Cum secvențele telomerice nu sunt perfect omoloage, alterarea funcției acestor gene poate conduce la recombinări între capetele cromozomiale al căror rezultat ar fi menținerea lungimii telomerelor și, ca urmare, a capacității de proliferare. Pe de altă parte, deoarece mutațiile genelor MMR cresc rata mutațiilor, creșterea capacității de proliferare telomerază-independentă poate fi secundară apariției unor mutații la nivelul genelor care influențează recombinarea telomerelor. De exemplu, unele mutații ale ADN-polimerazei δ pot avea consecințe asemănătoare.

Una dintre caracteristicile constante ale liniilor celulare imortalizate este aneuploidia. Semnificația și bazele moleculare ale acestei asocieri sunt însă incomplet cunoscute.

2. Modificări epigenetice în cancer

Mecanismele epigenetice sunt esențiale pentru dezvoltarea normală și pentru menținerea modelelor de expresie genică cu specificitate tisulară în succesiunea generațiilor de celule (vezi capitolul 4). Alterarea mecanismelor epigenetice este considerată în prezent ca fiind una dintre trăsăturile definitorii ale bolii canceroase. Până nu de mult, inițierea și progresia cancerului erau considerate rezultatul exclusiv al unor mutații genice. În prezent, modificările epigenetice sunt larg recunoscute a avea un rol major în aceste procese. Dezvoltările recente ale metodelor de analiză a componentelor mașinăriei epigenetice au permis caracterizarea a numeroase alterări epigenetice în cancer, de la tulburări ale metilării ADN la anomalii ale modificărilor post-translaționale ale histonelor și ale poziției sau compoziției nucleozomilor din structura cromatinei. Deoarece modificările epigenetice sunt

potențial reversibile, ele constituie în prezent ținta unor numeroase eforturi de dezvoltare a unor noi metode de terapie în cancer (vezi mai jos).

a. Tulburări ale metilării ADN

Alterările metilării ADN sunt prima anomalie epigenetică identificată în cancer. Epigenomul celulelor canceroase este caracterizat printr-o marcată *hipometilare globală* a ADN asociată în mod paradoxal cu *hipermetilarea unor insule CpG* localizate la nivelul promotorilor unor gene specifice. Mecanismele care operează aceste modificări globale sunt încă incomplet înțelese. Date recente au arătat însă că unele dintre aceste modificări apar foarte precoce în cursul dezvoltării tumorale și ar putea chiar contribui la inițierea bolii canceroase.

- *Hipometilarea globală a ADN* joacă un rol important în tumorigeneză și afectează în special elemente ADN repetitive, retrotranspozoni, regiuni promotor sărace în dinucleotide CpG, introni și regiuni cromozomiale cu conținut genic redus. Hipometilarea retrotranspozonilor poate conduce la activarea și translocarea lor în alte regiuni cromozomiale, generând astfel instabilitate genomică. De asemenea, hipometilarea ADN poate conduce la activarea unor gene care promovează creșterea celulară, precum *MAPSIN* în cancerul gastric, *S100* în cancerul de colon sau *MAGE* în melanoamele maligne. În sfârșit, hipometilarea poate conduce la pierderea amprentării (*loss of imprinting* – LOI) și la expresia bialelică a genei *IGF2* în tumorile Wilms și în cancerele de colon.
- *Hipermetilarea ADN* contribuie, de asemenea, la tumorigeneză prin inactivarea unor gene supresoare de tumori, precum *RB*, *P16*, *APC*, *CDH1*, *LBK1*, *VHL* etc. Inactivarea epigenetică a unor asemenea gene supresoare de tumori poate servi ca a „doua lovitură" în cadrul modelului „two-hit" al lui Knudson (vezi mai sus), conducând astfel la inițierea cancerului. Pe lângă inactivarea directă a unor gene supresoare de tumori, hipermetilarea ADN poate inactiva unele gene de stabilitate (*MLH1* sau *BRCA1)*, permițând celulelor să acumuleze rapid noi mutații care accelerează progresia cancerului.

b. Anomalii ale modificărilor post-translaționale ale histonelor

Noile metode de analiză la scara întregului genom au permis cartografierea multor anomalii ale modificărilor histonelor în cancer:

- *Reducerea globală a acetilării histonelor*, precum cea a lizinei din poziția 16 a histonei H4 (H4K16ac), este mediată de creșterea activității histon-dezacetilazelor (HDAC) sau reducerea activității histon-acetiltransferazelor (HAT). Numeroase translocații cromozomiale întâlnite în leucemii conduc la formarea unor gene de fuziune care interesează proteine HAT.
- *Alterarea globală a metilării histonelor*, constând în reducerea trimetilării lizinei 20 a histonei H4 (H4K20me3) sau tulburări ale distribuției H3K9me2 și H3K27me3, sunt frecvente în cancer. Multe dintre aceste tulburări apar ca urmare a dereglării activității unor histon-metiltrasferaze sau histon-demetilaze răspunzătoare de adiția, respectiv eliminarea acestor modificări post-translaționale.

  De exemplu, EZH2, o histon-metiltransferaza responsabilă de H3K27me3, este hiperexprimată în cancerele de sân și prostată. Creșterea activității G9a, histon-metiltransferaza responsabilă de H3K9me2, a fost descrisă în cancerele hepatice. În sfârșit, LSD1, o histon-demetilază responsabilă de eliminarea H3K9me2 este foarte activă în neuroblastoame, iar inhibiția sa *in vitro* conduce la reducerea proliferării celulelor tumorale.

c. Anomalii ale poziției și compoziției nucleozomilor

Studii recente au arătat că *remodelarea poziției nucleozomilor* joacă un rol important în procesul de inactivare a genelor supresoare de tumori alături de hipermetilarea ADN și de anomaliile modificărilor histonelor. Astfel, porțiunile 5' ale genelor supresoare de tumori sunt caracterizate prin absența nucleozomilor atunci când sunt active, dar sunt ocupate cu nucleozomi atunci când devin inactivate în cancer. Printre complexele de remodelare a nucleozomilor care mediază acest proces se numără NuRD (*nucleosome remodeling and deacetylase corepressor*) și componente ale complexului ATP-dependent SWI/SNF precum BRG1 și BRM inactivate în 15-20% din cancerele pulmonare epiteliale.

Pe lângă complexele de remodelare a nucleozomilor, varianta histonică H2A.Z a fost implicată, de asemenea, în tumorigeneză. H2A.Z este prezentă în exces în câteva forme de cancer și a fost asociată cu promovarea progresiei ciclului celular. Deficitul H2A.Z a fost de asemenea implicat în progresia tumorală prin posibila destabilizare a granițelor dintre diversele domenii cromozomiale care conduc la expansiunea heterocromatinei în zonele eurocromatice.

3. Mutații ale ADN mitocondrial în cancer

Genomul mitocondrial este mai vulnerabil la alterările oxidative și are o rată mai înaltă a mutațiilor decât genomul nuclear. Tumorile prezintă adeseori mutații ale ADNmt. Asemenea alterări au fost identificate în cancerele de vezică urinară, sân, colon, cap și gât, rinichi, ficat, stomac, în leucemii și limfoame.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

Rata crescută a mutațiilor la nivelul genomului mitocondrial poate fi explicată prin trei factori:
- localizarea în apropierea lanțului de transport al electronilor care generează o concentrație crescută a speciilor reactive de oxigen;
- existența unor capacități limitate de reparare a leziunilor ADN mitocondrial în raport cu cel nuclear;
- absența protecției asigurate de histone și de organizarea sub forma fibrelor de cromatină.

Deoarece ADNmt nu conține introni, majoritatea mutațiilor apar la nivelul secvențelor codante.

Fiecare tip de cancer analizat pare să conțină un model caracteristic al mutațiilor ADNmt, ceea ce sugerează că aceste mutații ar putea fi un component esențial în evoluția tumorilor. Există mai multe explicații posibile ale modului în care aceste mutații ar putea interveni în evoluția multistadială a cancerelor.

- Una dintre consecințe ar putea fi *creșterea producției radicalilor liberi de oxigen* care sporește și mai mult rata mutațiilor. Pe lângă efectul lor mutagen, radicalii liberi de oxigen au și rol de reglare a multor căi de semnalizare intracelulară. De exemplu, interacțiunea radicalilor liberi de oxigen cu lipidele sau cu proteinele care conțin grupări tiol este importantă pentru procesele de creștere și diferențiere celulară.
- *Accentuarea capacității de glicoliză anaerobă* este una dintre consecințele cele mai importante ale disfuncției mitocondriale în cancer. Cantitatea de ATP astfel produsă este însă mai mică decât în celulele normale. Ca urmare, sunt afectate toate procesele celulare dependente de ATP, precum transcripția, replicarea ADN, repararea și recombinarea ADN. O altă consecință a glicolizei anaerobe este creșterea producției de NADH, care conduce la inactivarea PTEN. Inhibiția PTEN are ca rezultat activarea AKT care augmentează și mai mult glicoliza anaerobă;
- O altă consecință importantă a disfuncției mitocondriale în cancer este *creșterea rezistenței în fața mecanismelor de apoptoză*. Activarea AKT menționată mai sus conduce nu numai la exacerbarea glicolizei anaerobe, dar și la activarea căilor de supraviețuire celulară. În plus, unele mutații punctiforme ale genomului mitocondrial, cum sunt cele din pozițiile 8993 și 9176 din interiorul genei *ATP6*, previn apoptoza prin mecanisme încă incomplet elucidate.
- *Inserția unor fragmente ale ADNmt* în interiorul genelor nucleare ar putea fi o cauză a activării unor oncogene. Astfel de fragmente ale genelor ND4, citocromului c, oxidazelor I, II și III au fost identificate în mai multe cazuri în interiorul unor gene nucleare.

4. Angiogeneza tumorală

În organismele mature angiogeneza este suprimată în cea mai mare parte și numai 0,01% din celulele endoteliale suferă procese de diviziune celulară. Celulele tumorale secretă multipli factori angiogenetici, dar și numeroase enzime care facilitează eliberarea unor factori angiogenetici situați în matricea extracelulară. Până în prezent au fost identificate două căi majore de stimulare a angiogenezei tumorale:

a. Calea VEGF-VEGFR

Familia **factorilor de creștere VEGF** (*vascular endothelial growth factor*) cuprinde o serie de molecule înrudite structural: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D și PIGF (*placental growth factor*). Principalul mediator al angiogenezei tumorale este VEGF-A, numit de regulă simplificat VEGF. VEGF semnalizează în principal prin intermediul receptorului VEGFR2, care este exprimat la nivele crescute pe suprafața celulelor endoteliale angajate în angiogeneză. Receptorul VEGFR1 are capacități foarte reduse de semnalizare intracelulară, iar VEGFR3 mediază procesele de limfangiogeneză. Legarea VEGF la VEGFR2 conduce la dimerizarea acestuia din urmă, ceea ce induce două căi majore de semnalizare intracelulară: calea MAPK, răspunzătoare de stimularea proliferării celulare și calea PI3K-AKT, care crește capacitatea de supraviețuire a celulelor endoteliale.

Majoritatea cancerelor umane produc cantități crescute de VEGF; aceasta este consecința a numeroase mecanisme genetice și epigenetice care induc expresia sa. De exemplu, hipoxia, o caracteristică a numeroase tumori solide, induce expresia VEGF prin intermediul HIF1A și HIF2A (*hypoxia-inducible transcription factors*). Activarea VEGF poate fi, de asemenea, indusă prin inactivarea unor gene supresoare de tumori, printre care figurează TP53, VHL sau PTEN, sau activarea unor oncogene, precum RAS, SRC, EGFR sau ERBB2.

În anul 2004 FDA (*Food and Drug Administration*) a aprobat utilizarea primului anticorp monoclonal direcționat împotriva VEGF: *bevacizumab*. Între timp, au fost aprobate alte două medicamente antiangiogenetice, *sorafenib* și *sunitinib*, care sunt inhibitori ai unor receptori tirozin-kinazici, inclusiv VEGFR. Aceste medicamente s-au dovedit însă a avea efecte terapeutice relativ modeste (cu excepția cancerelor renale), în special datorită dezvoltării unor mecanisme de rezistență.

b. Calea Notch-DLL4

Receptorii Notch (1, 2, 3 și 4) sunt receptori localizați pe suprafața celulară ce intervin în numeroase procese care controlează diferențierea și proliferarea celulară. Acești receptori interacționează cu liganzi

transmembranari de pe suprafața celulelor adiacente, precum Jagged1, Jagged2, DLL1, DLL3 și DLL4. Dintre toți acești liganzi, DLL4 este exprimat exclusiv pe suprafața celulelor endoteliale. Interacțiunea DLL4 cu Notch1 și Notch4 conduce la o serie de evenimente proteolitice intracelulare care eliberează un domeniu intracelular al receptorilor Notch. Acest domeniu este apoi translocat în interiorul nucleului unde interacționează cu factori de transcripție și induce expresia unor gene-țintă. Expresia DLL4 este crescută în numeroase cancere, inclusiv ca efect secundar al expresiei crescute a VEGF.

În mod paradoxal, o serie de medicamente care țintesc DLL4, printre care se includ și unii anticorpi monoclonali, cresc angiogeneza tumorală, însă majoritatea vaselor astfel formate sunt anormale structural și compromise funcțional. Ca urmare, hipoxia tumorală este accentuată de până la șapte ori, iar creșterea tumorii este încetinită.

Studiul mecanismelor care controlează angiogeneza tumorală a făcut posibilă și identificarea unor factori endogeni cu efect inhibitor: vasohibina, angiostatina, endostatina, trombospondinele 1 și 2 și tumstatina.

5. Rezistența în fața mecanismelor de moarte celulară programată

Rezistența celulelor canceroase în fața mecanismelor de moarte celulară programată reprezintă una dintre caracteristicile principale ale celor mai multe dintre cancerele umane. Există mai multe forme de moarte celulară programată, toate acestea putând fi alterate în cancer: apoptoza, autofagia și necroptoza.

a. Apoptoza

Există două căi majore de declanșare a apoptozei (vezi și capitolul 14.A): o cale extrinsecă, mediată de receptori membranari, și o cale intrinsecă sau mitocondrială (Figura 18.6).

- *Calea extrinsecă* este declanșată prin atașarea unor liganzi la nivelul unor receptori membranari specifici care fac parte din superfamilia receptorilor pentru factorul de necroză tumorală: ligandul CD95L recunoaște receptorul CD95, iar ligandul TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) recunoaște receptorul TRAIL-R. Cuplarea acestor liganzi la receptorii corespunzători determină recrutarea caspazei-8 în cadrul complexului membranar DISC (*death inducing signaling complex*). Recrutarea caspazei-8 în complexul DISC este inhibată de o serie de proteine, printre care FLIP și PED. Atunci când are loc cuplarea caspazei-8 la complexul DISC, evenimentul induce propria sa activare. Caspaza-8 activată poate cliva în mod direct o

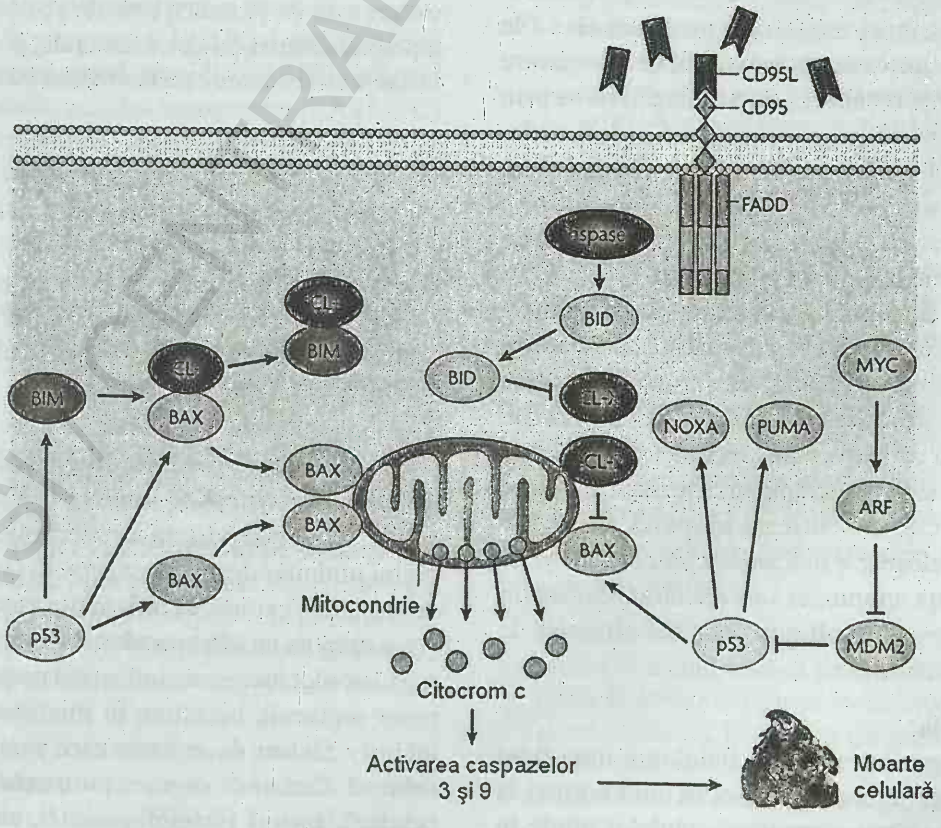


Figura 18.6. Căi de semnalizare implicate în apoptoză
(după Cotter, 2009)

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

serie de alte caspaze precum caspaza-3, răspunzătoare de inducerea apoptozei. Caspaza-8 poate promova, de asemenea, permeabilizarea membranei mitocondriale externe prin clivarea Bid, proteină care este translocată în urma clivării în interiorul mitocondriei şi care determină eliberarea citocromului c.

- *Calea intrinsecă* este declanşată prin eliberarea de factori pro-apoptotici, cum sunt citocromul c sau Smac (*second mitochondria-derived activator of caspase*) din spaţiul mitocondrial intermembranar în citoplasmă. Permeabilizarea membranei mitocondriale este, la rândul său, inhibată de proteinele Bcl-2 şi Bcl-X_L. Eliberarea citocromului c în citoplasmă activează caspaza-3 prin formarea unui complex citoplasmatic numit apoptozom care conţine citocromul c, proteina Apaf-1 şi caspaza-9. Smac creşte şi mai mult activitatea caspazei-3 prin inhibiţia proteinelor IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*) care în mod normal inactivează caspaza-3 şi caspaza-9.

În cancer, inducerea apoptozei pe *calea extrinsecă* poate fi inhibată de mutaţii (cancere de sân, ficat, plămân etc.), de reducerea expresiei (leucemii, neuroblastoame) sau de atenuarea epigenetică a receptorilor membranari CD95 şi TRAIL-R (cancere de colon), precum şi prin expresia aberant crescută a proteinei FLIP (cancere gastrointestinale), sau prin inactivarea de către mecanisme epigenetice a caspazei-8 (în neuroblastoame, sarcoame Ewing, retinoblastoame etc.).

La rândul său, inducerea apoptozei pe calea intrinsecă, mitocondrială, poate fi blocată prin hiper-expresia proteinelor anti-apoptotice Bcl-2 (de exemplu, în limfoamele foliculare), prin mutaţii ale proteinei Bax (de exemplu, în cancerele de colon cu deficite de reparare a erorilor de împerechere), sau prin inactivarea prin mecanisme epigenetice a proteinei Apaf-1 (ca în melanoame, leucemii, glioblastoame sau cancere gastrice). În sfârşit, activarea caspazei-3 poate fi blocată şi prin expresia crescută a proteinelor IAP (în neuroblastoame, limfoame sau cancere pulmonare).

Sustragerea de sub acţiunea mecanismelor normale ale apoptozei în cancer este importantă nu numai pentru iniţierea şi progresia tumorală, dar şi pentru rezistenţa la metodele majore de terapie folosite în prezent. Aceasta pentru că majoritatea metodelor actuale de chimio-, radio- şi imunoterapie au ca rezultat activarea mecanismelor care declanşează apoptoza. De aceea, o mai bună înţelegere a mecanismelor normale şi de rezistenţă în faţa apoptozei va avea fără îndoială un rol major pentru dezvoltarea unor noi strategii de tratament în cancer.

b. Autofagia

Autofagia este un răspuns fiziologic important care, la fel ca apoptoza, operează în mod normal la un nivel bazal scăzut, permiţând celulelor aflate în condiţii de stres să recicleze unele organite intracelulare (ribozomi, mitocondrii) în scopul obţinerii de cantităţi crescute de energie. Stimulii care blochează apoptoza, precum semnalizarea pe căile PI3K, AKT sau mTOR inhibă de asemenea şi autofagia. Un eveniment esenţial pentru declanşarea autofagiei este activarea proteinei beclina-1. Inactivarea genei care codifică această proteină determină creşterea riscului de dezvoltare a unor tumori. Paradoxal însă, multe din mijloacele terapeutice folosite în prezent, precum radioterapia sau chimioterapia, deşi induc nivele crescute de autofagie ale celulelor tumorale, par să exercite pe această cale efecte citoprotectoare pentru celulele canceroase. De aceea se consideră că autofagia ar exercita efecte opuse în cursul evoluţiei cancerului: suprimarea tumorigenezei în stadiile precoce şi favorizarea progresiei tumorale în stadii avansate.

c. Necroptoza

Moartea celulară prin necroză este controlată genetic în anumite circumstanţe (necroptoza). Deosebirea cea mai importantă a acestei forme de moarte celulară programată faţă de apotoză şi autofagie este eliberarea de către celulele care mor a unor semnale inflamatorii care determină recrutarea unor celule ale sistemului imun. Celulele imune astfel recrutate pot elibera o serie de factori care promovează angiogeneza, proliferarea celulară şi invazia tumorală. În plus, celulele necrotice pot elibera o serie de factori precum IL-1α, care stimulează direct proliferarea celulelor viabile din jur. Ca urmare, necroza tumorală, deşi la prima vedere este un fenomen benefic ce contrabalansează hiperproliferarea celulelor tumorale, poate fi în ultimă instanţă un fenomen care facilitează evoluţia tumorală.

6. Inflamaţia tumorală

Unele tumori sunt infiltrate dens cu celule ale sistemului imunitar, determinând un aspect histopatologic asemănător adesea cu un proces inflamator acut. Evoluţia tehnologică din ultimii ani, care a permis detecţia mai bună a celulelor sistemului imunitar, a arătat că aproape toate tumorile prezintă diferite grade de infiltraţie cu celule imunitare. Prezenţa acestor celule a fost considerată a reflecta încercările sistemului imunitar de a eradica tumora (vezi mai jos). A devenit însă evident că inflamaţia asociată tumorilor poate exercita un efect paradoxal de stimulare a progresiei tumorilor incipiente. Inflamaţia poate furniza numeroare molecule bioactive în micromediul tumoral, inclusiv factori de creştere care susţin proliferarea celulară, factori de supravieţuire care reduc moartea celulară, factori proangiogenetici, enzime extracelulare care modifică matricea extracelulară şi facilitează angiogeneza, invazia şi metastazarea etc.

În anumite circumstanțe inflamația poate fi prezentă chiar în stadiile inițiale ale dezvoltării tumorale și poate participa activ la evoluția tumorilor incipiente în cancere invazive. Printre moleculele bioactive eliberate de celulele inflamatorii, un rol special îl au speciile reactive de oxigen care, prin efectul lor mutagen asupra celulelor canceroase, pot accelera evoluția lor genetică către stadii avansate de malignizare.

7. Reprogramarea metabolismului energetic

Proliferarea celulară cronică și necontrolată conduce la ajustări importante ale metabolismului energetic pentru a susține creștere și diviziunea celulară. În condiții aerobiotice, celulele normale transformă glucoza în piruvat la nivelul citoplasmei, iar ulterior în dioxid de carbon la nivelul mitocondriilor. În condiții anaerobiotice este favorizată glicoliza și doar o mică parte din piruvat este catabolizat în mitocondrii. În schimb, în celulele canceroase, chiar în condiții de aerobioză, majoritatea energiei celulare este furnizată pe calea glicolizei. Acest proces a fost numit glicoliză aerobă sau efect Warburg.

Această modificare a metabolismului celulelor canceroase este la prima vedere paradoxală, întrucât reduce eficiența producerii ATP de 18 ori față de fosforilarea oxidativă mitocondrială. Această adaptare este posibilă întrucât celulele canceroase intensifică importul de glucoză în citoplasmă, în special prin creșterea expresiei transportorului glucidic GLUT1. Efectul Warburg este asociat activării oncogenelor (RAS MYC) sau mutației unor tumori supresoare de tumori (TP53). În condiții de hipoxie, caracteristică multor tumori în stadii avansate, glicoliza poate fi stimulată prin creșterea expresiei factorilor de transcripție HIF1α și HIF2α.

Se pare că principalul avantaj al utilizării glicolizei aerobe este acela al generării de nucleozide și aminoacizi care sunt folosiți pentru biosinteza de macromolecule și organite celulare necesare în cadrul diviziunii celulare rapide. S-a observat că un metabolism de tip Warburg este prezent și în stadiile precoce de dezvoltare embrionară.

În unele tumori au fost descrise două subpopulații de celule care diferă între ele în ceea ce privește căile de generare a energiei, dar funcționează în simbioză. Unele dintre aceste celule sunt dependente de glucoză și secretă lactat ca deșeu, care este preluat de către cea de-a doua populație de celule ce importă preferențial lactatul pe care îl metabolizează pe calea ciclului acidului citric. Mutații cu câștig de funcție ale izocitrat dehidrogenazelor 1 și 2 (IDH1/2) în unele tumori precum glioamele favorizează reprogramarea metabolismului energetic al celulelor canceroase.

8. Sustragerea de sub controlul mecanismelor imunologice de apărare antitumorală

Declanșarea unor mecanisme imunologice de apărare antitumorală este posibilă prin recunoașterea a două categorii de antigene de pe suprafața celulelor canceroase: antigene tumorale specifice și antigene asociate tumorilor.

- *Antigenele tumorale specifice*, exprimate doar de către celulele tumorale, pot fi:
  - *antigene virale*, produși ai unor virusuri tumorale. Exemple sunt produșii genelor E6 și E7 ai virusului *Papilloma* uman răspunzător de inițierea cancerului de col uterin, antigenul EBNA-1 al virusului Epstein-Barr care induce apariția limfoamelor Burkitt și a cancerelor naso-faringiene etc.
  - *proteine mutante*, apărute cel mai adesea ca urmare a alterării mutaționale a unor gene normale sau ca urmare a translocațiilor cromozomiale care induc formarea unor proteine himeră. Un exemplu este cel al proteinei RET-PTC în cancerele tiroidiene.
- *Antigene asociate tumorilor*. Asemenea molecule pot fi prezente și în celulele normale; în celulele maligne ele induc însă apariția unui răspuns imunologic deoarece:
  - sunt exprimate la titruri anormal crescute; de exemplu, ciclina B1 este exprimată în nucleul celulelor normale în cantități foarte reduse și doar în faza de tranziție G2-M a ciclului celular; dimpotrivă, în multe cancere ciclina B1 este exprimată la niveluri foarte înalte și poate induce apariția unui răspuns imunitar;
  - sunt ținta unor modificări post-translaționale anormale: glicozilare, fosforilare etc.;
  - sunt prezente pe suprafața unor celule care nu le exprimă în mod obișnuit; de exemplu, antigenele MAGE-1 și NY-ESO-1 sunt exprimate în mod normal doar în testicul, dar sunt sunt prezente în melanoamele maligne.

Eliminarea eficientă a celulelor canceroase de către sistemul imunitar (Figura 18.7) este realizată prin mecanisme citotoxice induse ca urmare a activării de către antigenele tumorale a celulelor dendritice mature care sintetizează IL12 și determină formarea în ganglionii limfatici regionali a limfocitelor tip Th1/CD4$^+$. Acestea produc la rândul lor IFNγ și IL2 care ajută la expansiunea limfocitelor citotoxice CD8$^+$ ce vor distruge celulele tumorale prin producerea de granzime și perforine.

De multe ori însă antigenele tumorale și o serie de produși tumorali solubili promovează activarea unor celule dendritice de tip imatur care produc IL6 și TNFα și induc, totodată, formarea în ganglionii limfatici regionali a limfocitelor tip Th2/CD4$^+$. Acestea din urmă produc IL4 și IL13 care ajută la expansiunea limfocitelor T reglatoare. Limfocitele T reglatoare nu au activitate citotoxică împotriva tumorii și, în plus, produc IL10 și TGFβ care au activitate imunosupresivă. De asemenea,

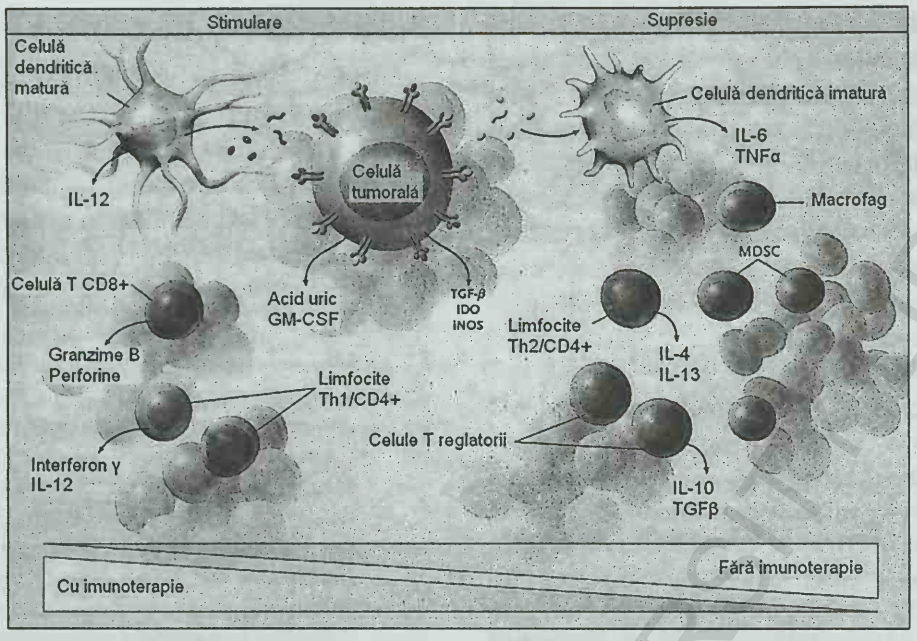


Figura 18.7. Procese de imunostimulare şi de imunosupresie în cancer
(după Finn, 2008)

limfocitele T reglatoare induc şi acumularea locală de macrofage şi MDSC (*myeloid-derived suppressor cells*), care sunt markeri ai unor mecanisme ineficiente de luptă imunologică antitumorală. Celulele tumorale pot produce o serie de substanţe cu capacitate imunosupresivă: IDO (indolamine-2,3-dioxygenase) şi iNOS (*inducible nitric oxide synthase*).

9. Invazia şi metastazarea

Dobândirea capacităţilor de invazie şi metastazare reprezintă cauza majoră de deces în cancer. Deşi considerată iniţial drept o etapă finală în evoluţia cancerului, o serie de date mai recente arată că celulele canceroase pot disemina foarte precoce în evoluţia unui cancer. De exemplu, au fost identificate cazuri în care celulele tumorale au fost prezente în măduva osoasă a unor paciente cu cancere de sân în stadii timpurii ale bolii. Cel mult 0,01% dintre celulele unei tumori care pătrund în circulaţie vor constitui în final metastaze. Acest fapt subliniază complexitatea proceselor care intervin în achiziţia capacităţii de invazie şi metastazare. În mod didactic pot fi distinse două categorii de gene care controlează aceste procese:

a. Gene care promovează invazia şi metastazarea

Aceste gene au fost clasificate la rândul lor în trei categorii: gene de iniţiere a metastazelor, gene de progresie şi gene de virulenţă.

- **Genele de iniţiere a metastazelor** controlează etapele cele mai timpurii ale acestor procese: invazia, angiogeneza şi tranziţia celulelor canceroase de la un fenotip epitelial, cu interacţiuni intercelulare puternice, la unul mezenchimal, uşor detaşabil şi mobil. Astfel de gene sunt: *RHOC*, *LOX*, *VEGF*, *ID1*, *TWIST1*, *MET*, *FGFR*, *MMP9*, *NEDD9* etc. De exemplu, GTP-aza calciu-dependentă RHOC controlează mobilitatea celulară şi stimulează apariţia metastazelor in cancerele pulmonare. NEDD9 este o proteină a citoscheletului implicată în controlul adeziunii celulare, iar metaloproteinaza MMP9 este importantă în penetrarea de către celula tumorală a membranei bazale.
- **Genele de progresie a metastazelor** conferă celulelor canceroase anumite avantaje pe parcursul deplasării acestora către sediul unde vor forma metastaza. Ele guvernează procese de remodelare vasculară, sustragerea de sub acţiunea mecanismelor imune de apărare antitumorală sau procesele de extravazare. Astfel de avantaje sunt răspunzătoare adeseori de specificitatea organului în care se vor dezvolta metastazele. Exemple de astfel de gene sunt: *EREG*, *COX2*, *CCL5*, *MMP1*, *ANGPTL4* etc. Astfel, exprimarea *ANGPTL4* de către celulele cancerelor mamare devine importantă atunci când acestea ajung la nivelul capilarelor pulmonare, favorizând dezvoltarea metastazelor la acest nivel. Pe de altă parte, expresia MMP1 este necesară pentru dezvoltarea metastazelor pulmonare, dar şi osoase în cancerelor de sân.
- **Genele de virulenţă a metastazelor** îndeplinesc funcţii cu specificitate de organ. Asemenea gene sunt: *CXCR4*, *RANKL*, *CTGF*, *IL11*, *EDN1*, *SPP1* etc. De exemplu, metastazele osoase cu originea în cancerele mamare prezintă expresia crescută a genelor *CXCR4*, *CTGF*, *IL11* şi *SPP1*, rezultatul fiind producerea de leziuni cu caracter osteolitic. Dimpotrivă, metastazele osoase cu originea în cancerele de prostată au expresia crescută a *EDN1* şi *RANKL*, ceea ce conduce la dezvoltarea metastazelor caracteristice cu aspect osteoblastic.

b. Gene supresoare ale metastazării

Genele supresoare ale metastazării acţionează prin mecanisme diferite faţă de genele supresoare de tumori

şi nu au nici un efect asupra tumorilor primare. Până în prezent au fost identificate câteva gene care au adeseori activităţi specifice anumitor tipuri de cancere.

Astfel, gena *NM23* suprimă dezvoltarea metastazelor în melanoame, cancere de sân şi colon. Proteina NM23 are activitate de nucleozid difosfat kinază ce inhibă o serie de procese care promovează diviziunea celulară. *MKK4* suprimă dezvoltarea metastazelor în cancerele de prostată şi cele ovariene prin facilitarea apoptozei. *KAI1* inhibă apariţia metastazelor în cancerele de sân şi prostată prin formarea unor complexe cu integrinele şi determină inhibarea detaşării şi migrării celulelor canceroase. *BRMS1* inhibă dezvoltarea metastazelor în cancerele de sân prin controlul joncţiunilor gap intercelulare. *KISS1* codifică o proteină receptor ce suprimă apariţia metastazelor în cancerele de sân şi în melanoame. *STK11* codifică o serin-protein kinază care reglează activitatea NEDD9 şi suprimă apariţia metastazelor în cancerele pulmonare. Alte gene supresoare ale metastazelor sunt *RHOGD12* în cancerele de vezică urinară, *CRSP3, GAS1* şi *VDUP1* în melanoamele maligne etc.

Identificarea unor gene implicate în controlul proceselor de invazie şi metastazare a condus la dezvoltarea unor aplicaţii clinice. O primă asemenea aplicaţie o constituie identificarea unor *markeri moleculari ai metastazării* cu valoare prognostică sau care influenţează deciziile terapeutice[6]. În al doilea rând, fiecare dintre genele specifice care promovează metastazarea reprezintă o *ţintă potenţială pentru proiectarea unor noi metode de terapie* a cancerului. Câteva exemple de asemenea noi agenţi terapeutici aflaţi în trialuri clinice sunt *denosumab* (un anticorp monoclonal împotriva proteinei RANKL), *ARQ 197* (inhibitor al genei de iniţiere a metastazelor *MET*) etc.

10. Modele de evoluţie multistadială a cancerelor

Nu există seturi specifice de gene ale căror mutaţii să conducă la dezvoltarea unui anumit tip de cancer. Cu toate acestea, necesitatea expansiunii clonale şi a instabilităţii genetice impune o anumită regularitate a producerii modificărilor. Mutaţiile genetice întâlnite în etapa iniţială (de inducţie) pot fi în mod particular mult mai specifice decât cele ulterioare, produse în cadrul progresiei tumorale.

Uneori relaţia cauzală dintre o anumită modificare genetică şi tipul particular de cancer în care apare aceasta este una logică. De exemplu, translocaţiile oncogenei MYC la nivelul unui locus Ig este logic să inducă perturbări ale celulelor care exprimă imunoglobulinele la un nivel foarte înalt Alteori însă, nu există nici o asemenea conexiune aparentă. De exemplu, factorii care conduc la dezvoltarea unor forme particulare de cancer ca urmare a mutaţiilor unor gene ce codifică proteine esenţiale pentru activitatea tuturor celulelor (precum retinoblastoamele în cazul mutaţiei RB) sunt încă obscure. O posibilă explicaţie se găseşte în ipoteza *genelor gatekeeper* (Kinzler şi Vogelstein, 1996), conform căreia fiecare tip celular este caracterizat printr-o genă particulară răspunzătoare de *controlul proliferării şi de menţinerea homeostaziei tisulare*. Mutaţia acestei gene *gatekeeper* se soldează cu un dezechilibru între rata diviziunilor şi cea a morţii celulare, în timp ce mutaţiile altor gene nu au nici un efect pe termen lung dacă integritatea funcţională a genei *gatekeeper* nu este afectată.

Genele supresoare de tumori identificate prin studiul cancerelor ereditare sunt astfel de gene *gatekeeper* pentru ţesuturile respective: NF1 pentru celulele Schwann, VHL pentru celulele renale, APC pentru celulele epiteliale intestinale etc. Motivul pentru care gene larg exprimate sunt *gatekeeper* numai pentru un anumit tip celular rezidă probabil în diferenţele care există între reţelele complexe de semnalizare ale variatelor tipuri celulare, diferenţe care fac ca o anumită genă să aibă un rol dominant într-un anumit tip celular. Pentru cancerele care nu au echivalent mendelian este posibilă şi existenţa mai multor gene *gatekeeper*.

Prima formă de cancer pentru care a fost postulată secvenţa evenimentelor genetice răspunzătoare de evoluţia multistadială a fost cancerul colorectal (modelul Fearon şi Vogelstein, 1990 – figura 18.8). Acestea nu sunt singurele modificări genetice întâlnite în cancerele colorectale, dar sunt cele mai frecvent asociate cu un anumit stadiu evolutiv. Modele asemănătoare au fost construite şi pentru alte forme de cancer.

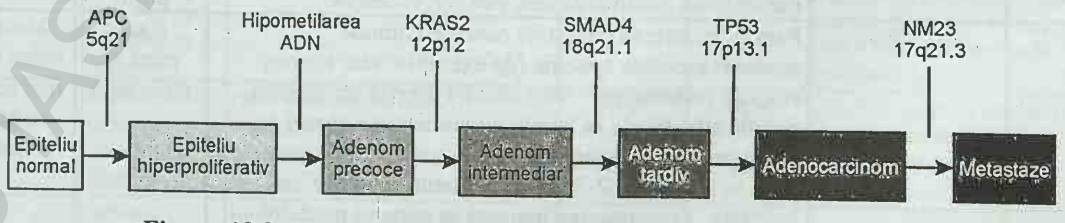


Figura 18.8. Modelul evoluţiei multistadiale a cancerului colorectal

(adaptat după Fearon şi Vogelstein, 1990)

6. De exemplu, MammaPrint test analizează concomitent 70 de gene asociate cu un prognostic rezervat în cancerele de sân, iar Oncotype Dx test analizează 21 de gene asociate cu un risc crescut de recurenţă în cancerul de sân precum receptorul estrogenic, ERBB2/Her2 şi markeri de proliferare.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

D. Predispoziția genetică în cancer

Principala trăsătură care permite recunoașterea clinică a existenței unei predispoziții genetice este istoricul familial pozitiv. Cancerul este însă o afecțiune frecventă și, ca urmare, în unele familii se pot înregistra câteva cazuri, aparenta agregare familială fiind întâmplătoare. Predispoziția genetică poate îmbrăca un spectru larg, de la existența unor forme rare de cancere ereditare până la cancere cu predispoziție genetică, dar fără istoric familial sugestiv (tabelul 18.5).

În mod paradoxal, cea mai largă categorie de cancere cu predispoziție genetică în ceea ce privește incidența globală este cea fără agregare familială evidentă. De exemplu, în cazul cancerelor de sân și ovar, formele ereditare asociate mutațiilor genelor *BRCA1* și *BRCA2* (care induc un risc de 60-80% până la vârsta de 70 de ani) reprezintă sub 5% din total. În schimb, o alelă care ar induce un risc relativ egal cu 2 față de populația generală și care ar avea o frecvență de circa 20% în populație ar putea fi răspunzătoare de până la 20% din incidența acestor cancere.

1. Cancerele ereditare

Se cunosc aproximativ 50 de afecțiuni cu transmitere mendeliană care se asociază cu un risc foarte înalt de dezvoltare a unor forme specifice de cancer (tabelul 18.6). Studiul acestor boli a permis identificarea unor gene implicate și în formele sporadice de cancer. Majoritatea acestor boli sunt transmise dominant, dar există și sindroame cu transmitere recesivă. Se cunosc doar câteva boli determinate de moștenirea unei mutații germinale la nivelul unor oncogene, cele mai multe fiind asociate mutațiilor unor gene supresoare de tumori.

În prezent, testarea genetică pentru identificarea persoanelor cu risc din cadrul acestor familii este parte a managementului standard pentru unele dintre aceste sindroame (neoplaziile endocrine multiple tip 2, boala von Hippel-Lindau, retinoblastomul familial sau polipoza adenomatoasă familiala (vezi subcapitolul 18.D.1.5). Pentru alte sindroame, cum sunt *cancerele de sân și ovar ereditare* (vezi subcapitolul 18.D.1.6), *cancerul colorectal nonpolipozic ereditar* ori *sindromul Peutz-Jeghers*, testarea genetică este probabil benefică. În sfârșit, în alte sindroame, ca de exemplu sindromul Li-Fraumeni ori melanomul ereditar, testarea genetică fie nu este disponibilă, fie nu este de natură să modifice managementul medical.

Două trăsături importante ale cancerelor asociate acestor sindroame sunt specificitatea tisulară și expresia variabilă. Toate cancerele ereditare par să prezinte un grad crescut de *specificitate tisulară*, deși acestei constatări nu i s-a dat încă nici o explicație fiziologică bine fundamentată (vezi și subcapitolul 18.C). De asemenea, pare să existe o variabilitate substanțială în ceea ce privește vârsta de debut și tipul specific de cancer ce predomină în cadrul unor familii. Aceste variații pot fi datorate unor mutații diferite ale aceleiași gene (de exemplu, în boala von Hippel-Lindau, polipoza adenomatoasă familială, MEN2), dar și intervenției unor gene modificatoare ori a unor factori de mediu. Un interes particular suscită genele modificatoare care reduc penetranța mutațiilor genelor cauzatoare, atât pentru aprecierea corectă a riscului, cât și pentru dezvoltarea posibilă a unor noi metode de prevenție și tratament.

Tabelul 18.5. Tipuri de predispoziție genetică în cancer

Tipul	Incidența globală	Trăsături clinice	Frecvența alelelor	Riscul indus
Cancere ereditare	1-2%	Cancere rare sau combinații specifice de cancere. Uneori asocierea unor anomalii congenitale sau modificări fenotipice non-neoplazice. Transmitere mendeliană dominantă sau, mai rar, recesivă.	Rară: ~1 la 1.000 sau mai puțin	Crescut: 50-80% sau chiar mai mare
Cancere familiale	~ 10%	Familii cu câteva cazuri de cancere comune adeseori asociate specific (de exemplu: sân + ovar, colon + endometru + tract urinar). Există un spectru larg de situații, de la familii cu numeroase cazuri și debut precoce (dovada unei predispoziții puternice) până la familii cu 2-3 cazuri cu debut la vârste mai înaintate. Transmiterea îmbracă în general modelul unei boli dominante cu penetranța incompletă.	Rară până la frecventă	Moderat sau redus (1,5-5 ori mai mare decât în populația generală)
Predispoziție genetică fără dovada unei agregări familiale	Nu poate fi apreciată exact. Posibilă în multe cancere.	Cazuri singulare ce pot să apară în orice sediu, uneori cu una sau două rude afectate. Distribuția acestor cazuri în populație este determinată probabil de combinarea efectelor unor factori de risc genetici și de mediu.	Multiple alele comune	Redus (între 1,01 și 1,5 ori mai mare decât în populația generală)

BUJIASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 18.6. Sindroame cu transmitere ereditară a riscului de dezvoltare a cancerelor

Sindromul	Tumora primară	Alte cancere sau modificări fenotipice asociate	Gena	Localizare	Funcția produsului genic
Cancere transmise AD produse de mutații germinale cu activarea unor oncogene					
Tumori stromale gastrointestinale familiale	cancer gastro-intestinal stromal	pete cutanate hiperpigmentare, disfagie, tumori mastocitare	*KIT*	4q12	receptor transmembranar tirozin kinazic pentru factorul de creștere hematopoietică KITLG
Carcinomul renal papilar ereditar	cancer renal		*MET*	7q31	receptor transmembranar pentru factorul de creștere hepatocitar (HGF)
Tumori stromale gastrointestinale familiale	cancer gastro-intestinal stromal	mâini cu dimensiuni crescute	*PDGFRA*	4q12	Receptorul alfa pentru factorul de creștere plachetar
Neoplaziile endocrine multiple tip 2 (MEN2)	cancer medular tiroidian	Tipul 2A: feocromocitoame; hiperplazia paratiroidelor Tipul 2B: feocromocitoame; hamartoame ale mucoasei bucale și linguale	*RET*	10q11.2	receptor transmembranar tirozin kinazic pentru GDNF, artemina, neurturina și persefina
Cancere transmise AD produse de mutații germinale ce inactivează gene supresoare de tumori					
Retinoblastom familial	Retinoblas-toame	osteosarcoame	*RB1*	13q14.3	reglator al ciclului celular și al transcripției
Sindromul WAGR	tumori Wilms	anomalii genitale, aniridie, retard mental	*WT1*	11p13	represor al transcripției
von Hippel-Lindau	cancere renale cu celule clare	feocromocitoame, angioame retiniene, hemangioblastoame	*VHL*	3p25	reglator al translației
Carcinoamele nevoide bazocelulare	carcinoame cutanate bazocelulare	chisturi bucale, pistrui palmo-plantari, meduloblastoame, fibroame ovariene	*PTCH*	9q22.3	receptor transmembranar pentru semnalizarea prin moleculele *Hedgehog*
Boala Cowden	cancer de sân, tiroidian	polipi intestinali	*PTEN*	10q23.3	fosfataza
Sindromul Peutz-Jeghers	cancere intestinale	cancere ovariene, cancere testiculare	*STK11*	19p13.3	serin-treonin kinaza
Polipoza colonică juvenilă	cancere gastro-intestinale	cancere pancreatice, malformații cardiace, despicături labiale sau palatine, macrocefalie	*SMAD4* *BMPR1A*	18q21.1 10q22.3	mediator citoplasmatic al semnalizării pe calea TGF-β receptor serin-treonin kinazic
Melanomul familial	melanoame	cancere pancreatice, nevi displazici, mole atipice	*CDKN2A* *CDK4*	9p21 12q14	inhibitor al kinazelor CDK4/6 ce promovează tranziția G1-S a ciclului celular protein kinaza ce stimulează diviziunea celulară
Neurofibro-matoza tip 1	neurofibroa-me	neurofibrosarcoame, tumori cerebrale	*NF1*	17q11.2	reglarea proteinelor G RAS-like
Neurofibro-matoza tip 2	shwannoame vestibulare, meningioame	glioame, ependimoame, mezotelioame	*NF2*	22q12.2	legătura între proteinele membranare și proteinele citoscheletului
Schwannomatoza	schwannoa-me multiple cutanate și spinale		*SMARCB1*	22q12.2	reglator al cromatinei dependent de actină, înrudit cu complexul SWI/SNF, subfamilia B, membrul 1
Scleroza tuberoasă	hamartoame cancere renale, astrocitoame	rabdomioame, autism, epilepsie	*TSC1* *TSC2*	9q34 16p13	reglarea ciclului celular și a apoptozei, menținerea citoscheletului
Polipoza adenomatoasă familială	cancere colorectale	tumori duodenale și gastrice, anomalii retiniene, tumori ale cavității bucale, osteoame și tumori desmoide, meduloblastoame și glioblastoame (în sindromul Turcot)	*APC*	5q21	reglarea cateninei ß, component al citoscheletului celular
Cancerul gastric familial	cancer gastric		*CDH1*	16q22	caderina E implicată în adezivitatea celulară

BUJIAN CETEAN UNIVERSITY LIBRARY

Neoplaziile endocrine multiple tip 1 (MEN 1)	tumori pancreatice (insulele Langerhans	hiperplazia paratiroidelor, adenoame pituitare	*MEN1*	11q13	menina interacţionează cu factorul de transcripţie JUND pe care îl reprimă
Sindromul Li-Fraumeni	sarcoame, cancere de sân	tumori cerebrale, leucemii	*TP53*		factor de transcripţie, răspuns la alterările ADN şi rol în inducerea apoptozei
			CHK2		protein kinază activată ca răşpuns la alterările ADN
Cancerul de sân şi ovar ereditar	cancere de sân	cancere ovariene	*BRCA1*	17q21	repararea rupturilor ADN bicatenare, controlul transcripţiei
		cancere pancreatice, cancere de sân la bărbaţi	*BRCA2*	13q12	repararea rupturilor ADN bicatenare
Cancerul colorectal nonpolipozic ereditar (HNPCC)	cancere colorectale	cancere endometriale, ovariene, hepatobiliare şi vezicale, glioblastoame (sindromul Turcot)	*MSH2*	2p21	repararea erorilor de împerechere a ADN; menţinerea stabilităţii repetiţiilor simple în tandem ale ADN
			MLH1	3p21	
			PMS2	2q31.1	
			PMS1	7p22	
			MSH6	2p16	
			MSH3	5q11-q12	
			MLH3	14q24.3	
Cancere transmise AR produse de mutaţii ce inactivează gene supresoare de tumori					
Ataxia-telangiectazia	limfoame	degenerare cerebelară, sterilitate, imunodeficienţă	*ATM*	11q22	semnalizarea erorilor ADN
Sindromul Bloom	tumori solide	imunodeficienţa, hipostatură, anomalii pigmentare, fotosensibilitate, infertilitate, instabilitate cromozomială	*BLM*	15q26.1	ADN-helicaza
Xeroderma pigmentosum	cancere cutanate	fotosensibilitate, hipogonadism, uneori neurodegenerare şi retard mental	*XPB*	2q21	componente ale maşinăriei de repa-rare ale leziunilor ADN induse de radiaţiile UV, prin mecanismul de excizie a nucleotidelor (NER)
			XPD	19q13	
			XPA	9q22.3	
			XPC	3p25	
			XPF	16p13	
			XPE	11p11-p12	
			XPG	13q33	
Anemia Fanconi	leucemii	pancitopenie, hipoplazia radiusului, instabilitate cromozomială, uneori anomalii cardiace şi renale	*FANCA*	16q24.3	componente ale maşinăriei de repa-rare a legăturilor ADN încrucişate
			FANCC	9q22.3	
			FANCD	3p25.3	
			FANCE	6p22-p21	
			FANCG	9p13	
			FANCF	11p15	

1.1. Neoplaziile endocrine multiple tip 2 (MEN2)

MEN2 (OMIM # 171400) este o boală genetică transmisă autozomal dominant, care prezintă două variante clinice. *Varianta A* este cea mai frecventă şi este caracterizată printr-o incidenţă crescută a carcinoamelor tiroidiene medulare (cu originea în celulele parafoliculare C care produc calcitonina), asociate adeseori cu feocromocitoame şi/sau adenoame paratiroidiene benigne. *Varianta B*, mai rară, este caracterizată printr-un status marfanoid şi prin dezvoltarea tumorilor descrise în varianta A (în general cu debut mai precoce), dar şi a unor tumori benigne cu origine neurală (neurinoame) la nivelul mucoasei bucale şi al buzelor.

Mutaţiile responsabile de producerea MEN2 interesează gena *RET* (cromozomul 10q11) care codifică un receptor tirozin-kinazic pentru patru liganzi: factorul de creştere derivat din celulele gliale (GDNF), neurturina, artemina şi persefina. Legarea acestor liganzi produce dimerizarea receptorului care suferă o serie de modificări conformaţionale răspunzătoare de activarea proprietăţilor kinazice. Rezultatul este fosforilarea altor proteine intracelulare, cu declanşarea unei cascade de interacţiuni interproteice şi ADN-proteine. Mutaţiile aceleiaşi gene *RET* sunt responsabile de producerea bolii Hirschprung (megacolonul congenital). Spre deosebire de mutaţiile cu pierderea funcţiei răspunzătoare de producerea bolii Hirschprung, mutaţiile *RET* din cadrul MEN2A şi MEN2B sunt mutaţii punctiforme care activează receptorul şi îi permit acestuia să fosforileze tirozinele proteinelor ţintă în absenţa cuplării liganzilor.

Indivizii care au moştenit o mutaţie activatoare a *RET* au un risc de aproximativ 60% de a dezvolta carcinoame medulare de tiroidă simptomatice. În

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

MEN2B peste 95% din mutații sunt localizate la nivelul exonului 16 (M918T) sau a exonului 15 (A883F). În MEN2A mutațiile sunt diferite și interesează codonii pentru reziduurile cisteinice din porțiunea extramembranară a *RET*. MEN2 este un exemplu de boală genetică în care *testarea genetică precoce* se impune cu necesitate. Aceasta trebuie efectuată înaintea vârstei de 6 ani. Indivizii purtători ai mutațiilor trebuie să beneficieze, începând cu aceeași vârstă, de *screening* biochimic pentru identificarea feocromocitomului și a hiperparatiroidismului, precum și de tiroidectomie profilactică. În varianta MEN2B tiroidectomia trebuie efectuată chiar mai precoce.

1.2. Retinoblastomul familial

Retinoblastomul este o formă rară de tumoră embrionară cu origine în celulele retiniene. Incidența sa variază între 1 la 18.000 și 1 la 30.000. Retinoblastoamele se dezvoltă ca tumori sporadice în 60% din cazuri sau ca o boală genetică în restul de 40%. În forma familială de boală (OMIM + 180200) diagnosticul este de regulă mai timpuriu (în primele luni de viață față de 24-30 de luni pentru formele sporadice) și cel mai adesea tumorile sunt bilaterale. Pacienții care supraviețuiesc tumorii primare, ca urmare a unui diagnostic și tratament precoce, au un risc crescut pentru dezvoltarea unor neoplazii secundare (de până la 50% până la vârsta de 50 de ani), cele mai frecvente fiind osteosarcoamele, sarcoamele de părți moi și melanoamele. Utilizarea radioterapiei crește de asemenea riscul de dezvoltare a osteosarcoamelor în regiunile expuse acestei forme de tratament.

Forma familială de boală este rezultatul transmiterii unor mutații germinale ale genei supresoare de tumori *RB1* localizată pe cromozomul 13q14. Această genă codifică o proteină cu rol major în controlul ciclului celular, pe calea P16-RB-E2F1 (figura 18.9).

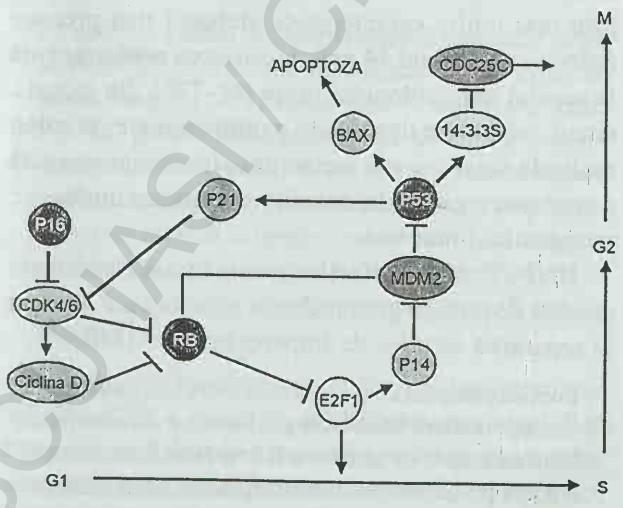


Figura 18.9. Controlul progresiei ciclului celular și al apoptozei

Activitatea de reglare a ciclului celular este realizată prin intermediul proteinei E2F1, un factor de transcripție cu care interacționează proteina RB. În faza G1 a ciclului celular proteina RB este hipofosforilată și aceasta permite interacțiunea sa cu E2F1, blocând activitatea de factor de transcripție a acesteia. Sub acțiunea complexelor cilină D – CDK4/6 (activate pe căi de stimulare induse de factori de creștere) proteina RB este fosforilată, ceea ce determină eliberarea factorului E2F1 ce își poate exercita astfel funcția de promovare a fazei S. Activitatea de fosforilare a complexului CDK4/6 este inhibată la rândul ei de către proteina P16. Genele-țintă ale proteinei E2F1 codifică proteine implicate în replicare (ADN polimeraza α și PCNA – antigenul nuclear de proliferare celulară, timidin kinaza, timidilat kinaza, ribonucleotid reductaza), repararea ADN (RAD51) sau controlul fazei S a ciclului celular (ciclina E, CDK2). Pe lângă activitatea de control a ciclului celular, RB intervine și în căile de declanșare a apoptozei. Astfel, E2F1 este capabilă să inducă expresia P14 care blochează funcția MDM2, principalul inhibitor al proteinei P53. Rezultatul este acumularea P53 care poate declanșa apoptoza.

Calea P16-RB-E2F1 este una dintre căile majore de control al ciclului celular și, ca urmare, o țintă frecventă a evenimentelor mutaționale în majoritatea cancerelor umane. Astfel, mutații ale *RB* au fost evidențiate în diverse cancere umane: osteosarcoamele, cancerele pulmonare microcelulare, cancerele de sân etc. Mutații ale *P16* sunt întâlnite frecvent în melanoamele maligne și alte forme de cancere. În sfârșit, amplificări ale ciclinei D, ca și ale *CDK4,* sunt întâlnite în sarcoame sau în glioame.

Conduita diagnostică în cazul unui copil cu retinoblastom impune diferențierea între formele sporadice și cele familiale de boală. Diagnosticul diferențial este posibil prin analiza ADN din sângele periferic și din țesutul tumoral. Analiza tumorii permite identificarea mecanismelor genetice care conduc la inactivarea celor două alele ale genei *RB1*. Prezența uneia dintre aceste mutații și în sângele periferic confirmă diagnosticul de formă ereditară. Mutațiile germinale astfel identificate la proband pot fi apoi folosite pentru testarea genetică a membrilor familiei cu risc de dezvoltare a bolii (în special copii).

Examinarea oftalmologică a nou-născuților cu istoric familial de boală este recomandată a se face lunar până la vârsta de 3 luni, la fiecare 2 luni până la vârsta de 7 luni (sub anestezie), la fiecare 3 luni până la vârsta de 18 luni și apoi la fiecare 6 luni până la vârsta de 3 ani. Ulterior este recomandată examinarea anuală până la vârsta de 7 ani. Acest program de *screening* poate fi evitat însă la copiii cu test genetic negativ atunci când se cunoaște prezența mutației *RB1* din familie.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.3. Sindromul Li-Fraumeni

Sindromul Li-Fraumeni (OMIM # 151623) este o boală genetică autozomal dominantă foarte rară (incidența 1 la 500.000 indivizi) caracterizată printr-un risc crescut de dezvoltare a unor cancere, în special sarcoame, cancere mamare, cerebrale, adrenocorticale, leucemii și limfoame. Clasic, sindromul Li-Fraumeni este diagnosticat clinic atunci când: a) un pacient diagnosticat cu sarcom înainte de 45 de ani are: b) o rudă de gradul I afectată de orice formă de cancer care a debutat înainte de 45 de ani, plus c) o rudă de gradul I sau II de pe aceeași linie parentală diagnosticată cu orice formă de cancer înainte de 45 de ani sau cu sarcom la orice vârstă. Peste 75% dintre acești pacienți dezvoltă cancere înainte de 45 de ani. De asemenea, incidența cancerelor multiple sincrone sau metacrone este foarte înaltă, atingând 57% la 30 de ani de la diagnosticul primei neoplazii. Alte forme de cancer care pot fi diagnosticate în cadrul acestui sindrom sunt cele de stomac, plămân, colon sau melanoamele maligne.

Mutațiile germinale ale genei supresoare de tumori *TP53* (17p13) sunt responsabile de 70-85% din cazurile clasice de sindrom Li-Fraumeni. Frecvența acestor mutații atinge până la 100% în familiile în care există cel puțin un caz de carcinom adrenocortical. Mutațiile genei *CHEK2* sunt răspunzătoare de o mică parte din cazurile de sindrom Li-Fraumeni.

Gena *TP53* este probabil una dintre cele mai intens studiate gene datorită faptului că suferă mutații în peste 50% din toate cancerele umane. Proteina codificată de această genă are un rol major în supresia tumorală. Activarea P53 poate fi realizată de diverși stimuli precum hipoxia, radiațiile ionizante, depleția nucleotidelor, alterări ale fusului mitotic, ori hiperexpresia unor oncogene. P53 este caracterizată drept un factor de transcripție, activitate esențială pentru rolul său de supresie tumorală. Câteva dintre genele-țintă răspunzătoare de blocarea ciclului celular și inducerea apoptozei sunt: gena pentru proteina P21 care inhibă activitatea kinazelor ciclin dependente ce promovează tranziția G1-S, gena pentru proteina 14-3-3(sigma) care induce blocarea ciclului celular la nivelul fazei G2 prin sechestrarea fosfatazei promitotice CDC25C, ori gena BAX responsabilă de inducerea apoptozei. În absența stimulilor de stres, nivelul P53 este menținut la nivele reduse prin intervenția MDM2 (vezi figura 18.3) care promovează degradarea acesteia pe calea ubiquitinării. Stimulii de stres, ca de exemplu, radiațiile ionizante induc fosforilarea serinei 20 a P53 prin intervenția kinazei CHEK2, ceea ce conduce la stabilizarea P53 și creșterea activității sale transcripționale. La rândul său, MDM2 este inhibată de către proteina P14 care formează cu aceasta un complex sechestrat la nivel nucleolar. Calea de control P14-MDM2-P53 este a două cale majoră de control a ciclului celular.

Diagnosticul sindromului Li-Fraumeni este clinic, deși există teste genetice disponibile. Impactul acestor teste genetice în managementul clinic al pacienților este considerat însă a fi unul redus, ca urmare a multiplelor sedii în care poate apărea un cancer. Totuși, unele studii au evidențiat anumite corelații genotip-fenotip. Astfel, mutațiile codonului 248 par a induce un risc mai înalt de dezvoltare a cancerelor de sân, în timp ce mutația R175H este asociată frecvent cu dezvoltarea leucemiilor acute. În plus, confirmarea prin teste genetice a diagnosticului acestei boli poate avea impact asupra deciziilor terapeutice, deoarece s-a constatat că utilizarea radioterapiei la acești pacienți crește semnificativ riscul dezvoltării unor cancere secundare. În condițiile în care diagnosticul nu s-a pus prin investigații moleculare este indicată o examinare clinică minuțioasă anuală începând cu vârsta de 20-25 de ani. Atunci când în familie apar cu predilecție anumite forme de cancer, monitorizarea trebuie să se adreseze organelor frecvent afectate.

1.4. Cancerul colorectal nonpolipozic ereditar (HNPCC)

HNPCC (OMIM # 114500), cunoscut și sub denumirea de **sindromul Lynch**, este cea mai frecventă formă de predispoziție genetică pentru cancerul de colon. Incidența în populația generală este de 1 la 1.000; circa 3-6% dintre pacienții diagnosticați cu neoplasm malign de colon provin dintre cei afectați de sindromul Lynch. HNPCC este caracterizat printr-un risc de 80% de dezvoltare a cancerului colorectal până la vârsta de 70 de ani și de 60% pentru cancerul endometrial la femei. Indivizii cu HNPCC au, de asemenea, un risc crescut de dezvoltare a altor cancere: gastric (13%), ovarian (12%), de intestin subțire, tract biliar, urinar, rinichi, SNC (4%). Cancerele de colon care se dezvoltă în cadrul HNPCC diferă de cele sporadice prin mai multe caracteristici: debutul mai precoce (vârsta medie fiind 44 ani), localizarea predominantă la nivelul hemicolonului drept (60-70% din cazuri), riscul crescut de dezvoltare a unor cancere de colon multiple sincrone sau metacrone, frecvența crescută a unor cancere coloide, cu infiltrat abundent limfocitar, prognosticul mai bun.

HNPCC este o afecțiune autozomal dominantă cauzată de mutații germinale ale genelor care intervin în repararea erorilor de împerechere – MMR.

Funcția esențială a acestui sistem este eliminarea erorilor de împerechere bază-bază și a buclelor de inserție-deleție care apar ca urmare a fenomenului de „derapaj" a ADN-polimerazei în cursul replicării ADN. Alterarea funcției acestor gene are drept consecință esențială apariția unor substituții nucleotidice (de exemplu G – T) ori

BCU "CAROL DAVILA" UNIVERSITY LIBRARY

câştigul sau pierderea unor unităţi repetitive scurte (tip CA) din constituţia microsateliţilor, fenomen denumit **instabilitatea microsateliţilor – MIN**. Există cel puţin şapte proteine MMR implicate în acest proces. Pentru recunoaşterea erorilor proteina MSH2 formează un heterodimer cu MSH6 (în cazul împerecherilor greşite bază-bază) sau cu MSH3 (în situaţia apariţiei unor bucle de inserţie-deleţie). Un alt heterodimer alcătuit din proteinele MLH1 şi PMS2 mediază interacţiunile dintre complexul de recunoaştere a erorii şi alte componente ale sistemului MMR. Acestea din urmă includ: antigenul nuclear de proliferare celulară (PCNA), ADN polimerazele delta şi epsilon, proteina de legare a ADN monocatenar, unele helicaze. Pe lângă PMS2, MLH1 poate forma complexe şi cu alte două proteine: MLH3 sau PMS1.

Majoritatea mutaţiilor răspunzătoare de apariţia familiilor cu HNPCC (peste 85%) interesează genele *MLH1* şi *MSH2*; mutaţiile *MSH6* generează până la 9% din cazuri, în timp ce mutaţiile altor gene răspund de o minoritate a cazurilor.

Nu există corelaţii genotip-fenotip bine definite, deşi mutaţiile *MSH2* par a fi asociate mai frecvent cu manifestările extracolonice decât mutaţiile *MLH1*. De asemeni, mutaţiile *MSH6* se asociază mai frecvent cu un debut tardiv, o incidenţa crescută a cancerelor endometriale şi un grad mai redus de instabilitate a microsateliţilor.

Instabilitatea microsateliţilor este întâlnită nu numai în HNPCC, ci şi în aproximativ 15% din cancerele de colon sporadice. La fel, o parte dintre cancerele de endometru ori stomac prezintă un grad accentuat de MIN. MIN este de fapt o marcă pentru instabilitatea la nivelul întregului genom şi se asociază cu o creştere a ratei mutaţiilor de 100-1.000 ori. MIN se asociază în special cu mutaţii ale unor gene importante pentru dezvoltarea cancerelor colorectale precum: *TGFBR2*, *IGFI2R*, *BAX* sau *TCF4*.

Există câteva seturi de criterii pentru diagnosticul clinic al HNPCC, printre cele mai utilizate fiind criteriile Amsterdam II (1999): a) trei rude cu cancere asociate HNPCC (colorectale, endometriale, de intestin subţire, ureter sau pelvis renal); b) una dintre persoane trebuie să fie ruda de gradul I cu celelalte două; c) afectarea trebuie să includă cel puţin două generaţii; d) cel puţin unul din pacienţi trebuie să fie diagnosticat înainte de 50 de ani; e) polipoza adenomatoasă familială trebuie exclusă.

Deoarece 95% dintre cancerele de colon dezvoltate în cadrul HNPCC prezintă instabilitatea microsateliţilor, testarea acestui fenotip trebuie efectuată înaintea testelor genetice pentru identificarea unor mutaţii ale genelor MMR la toţi pacienţii care întrunesc criteriile clinice de diagnostic.

Testarea pentru MIN trebuie efectuată însă şi la alte categorii de pacienţi, cum sunt cei diagnosticaţi înainte de 50 de ani, cei cu o rudă de gradul I diagnosticată cu cancer de colon sau endometrial sau cei care au fost diagnosticaţi anterior cu una dintre aceste neoplazii. Conform criteriilor internaţionale, MIN este definită ca fiind instabilitatea a cel puţin 2 din 5 loci testaţi sau a cel puţin 30-40% din totalul locilor studiaţi. Instabilitatea la nivelul unui număr mai mic de loci este definită ca MIN grad redus. Pacienţii cu criterii clinice pentru HNPCC şi MIN trebuie să beneficieze de analize pentru identificarea unor mutaţii MMR.

Se recomandă ca persoanele din aceste familii să beneficieze de *screening* pentru diverse variante de cancer. Astfel, colonoscopia trebuie începută la 20-25 de ani şi efectuată la fiecare 1-3 ani. *Screening*-ul pentru cancerul endometrial constă în analiza citologică a aspiratelor endometriale sau ultrasonografia transvaginală şi trebuie început la 25-35 de ani, cu repetare la fiecare 1-2 ani. *Screening*-ul pentru cancerele gastrice sau de tract urinar trebuie recomandat numai în familiile care au avut asemenea cazuri şi constă în gastroscopie, ecografie şi analize urinare efectuate la fiecare 1-2 ani începând cu vârsta de 30-35 de ani. Opţiunea colectomiei profilactice trebuie avută în vedere atunci când sunt identificate adenoame colonice sau la diagnosticul primului cancer de colon. De asemeni, histero-salpingo-ooforectomia bilaterală poate fi efectuată profilactic, mai ales că riscul de dezvoltare a cancerelor endometriale îl depăşeşte la aceste femei chiar pe cel al dezvoltării cancerelor de colon.

1.5. Polipoza adenomatoasă familială (FAP)

FAP (OMIM # 175100) este o boală rară (incidenţă 1 la 10.000), răspunzătoare de mai puţin de 1% din cazurile de cancer de colon, caracterizată prin dezvoltarea a sute sau mii de polipi adenomatoşi de-a lungul colonului şi rectului. În absenţa colectomiei profilactice, aproape 100% din pacienţii cu FAP dezvoltă cancer de colon, majoritatea până la vârsta de 40 de ani.

Polipii adenomatoşi pot să apară şi la nivelul tractului gastro-intestinal superior, determinând o creştere a riscului pentru cancerul duodenal, în special la nivelul ampulei lui Vater (5-8%). Indivizii cu FAP au un risc crescut pentru dezvoltarea hepatoblastoamelor în copilărie, a meduloblastoamelor (în varianta Turcot) şi a carcinoamelor papilare tiroidiene (în special la femei).

Alte manifestări fenotipice includ: dezvoltarea osteoamelor mandibulare (peste 90% din cazuri), a hipertrofiei congenitale a epiteliului pigmentar retinian – CHRPE – *congenital hypertrophy of the retinalpigment*

epithelium – (58-88%), prezența dinților supranumerari sau neerupți (33%). Tumorile desmoide apar la 5-10% dintre pacienții cu FAP, sunt mai frecvente la femei și reprezintă o cauză majoră de morbiditate și mortalitate. Există un grad crescut de variabilitate în cadrul acestui sindrom, astfel că pacienții pot avea orice combinație a trăsăturilor clinice și diferite grade de severitate. Sindromul Gardner este o variantă a FAP caracterizată prin prezența osteoamelor și a chisturilor desmoide.

FAP este o boală transmisă autozomal dominant, determinată de mutațiile genei *APC* (cromozomul 5q21). Aproape o treime dintre pacienții cu FAP au mutații *APC* de novo. 95% dintre mutațiile germinale sunt de tip nonsens sau cu decalarea cadrului de lectură și conduc la sinteza unei proteine trunchiate și cu funcții anormale. Cele mai frecvente mutații germinale interesează codonii 1061 și 1309 (o treime din total). Manifestările clinice ale FAP sunt corelate specific cu localizarea mutației la nivelul genei *APC*.

Astfel, polipoza severă (cu peste 5.000 polipi colorectali) apare frecvent la pacienții cu mutații situate între codonii 1250 și 1464. În contrast, forma atenuată de polipoză este atribuită unor mutații situate la nivelul extremităților 5' sau 3' ale genei, ori în regiunea de matisare alternativă de la nivelul exonului 9. CHRPE este prezentă numai la pacienții cu mutații între codonii 457 și 1444, iar tumorile desmoide în cazul mutațiilor localizate între codonii 1403 și 1578.

Gena *APC* codifică o proteină cu numeroase domenii funcționale care îndeplinește roluri importante în semnalizarea pe calea WNT, în adeziunea intercelulară, în stabilitatea citoscheletului microtubular, în reglarea ciclului celular și, posibil, în apoptoză.

APC împreună cu axina realizează un complex care promovează fosforilarea ß-cateninei de către glicogen sintetaz-kinaza 3ß (GSK3B). Rezultatul este inducerea degradării ß-cateninei. Mutațiile *APC* au efect similar cu stimularea pe calea WNT și determină acumularea ß-cateninei în citoplasmă și pătrunderea acesteia în nucleu unde se asociază cu factori de transcripție din familiile TCF și LEF, cărora le stimulează activitatea. Printre acești factori se numără TCF4, puternic exprimat în nucleii celulelor epiteliale intestinale. Complexul ß-catenină-TCF4 activează transcripția mai multor gene printre care MYC și ciclina D1 care intervin în controlul ciclului celular, conexina 43 care participă la formarea joncțiunilor intercelulare tip gap și matrilizina – o metaloproteinază.

Odată ce este stabilit diagnosticul de FAP, rudele de gradul I ale persoanelor afectate trebuie să fie considerate a avea un risc de 50% de a fi moștenit mutația. Testarea genetică este considerată un standard pentru această boală. Este recomandat ca testarea genetică să se facă la descendenții persoanelor afectate încă de la vârsta de 10-11 ani, aceasta fiind și vârsta când se recomandă începerea *screening*-ului clinic. Pentru familiile în care mutația nu este detectabilă, examenul endoscopic și/sau oftalmologic pentru identificarea CHRPE pot ajuta la diagnosticarea rudelor cu risc teoretic. Indivizii cu FAP beneficiază de sigmoidoscopie flexibilă începând cu vârsta de 10-11 ani. Colectomia profilactică poate fi efectuată în general între 17 și 20 de ani. În prezent sunt în curs de evaluare trialuri clinice de chemoprevenție cu antiinflamatorii nesteroidiene. În familiile fără mutații APC identificate, rudele cu risc teoretic ar trebui să efectueze sigmoidoscopie anual între 11-24 ani, la fiecare 2 ani între 24-35 ani, la fiecare 3 ani între 35-44 ani și la fiecare 3-5 ani după 45 de ani. Dacă între timp se dezvoltă polipi, *screening*-ul trebuie efectuat ulterior după regulile existente în cazul persoanelor afectate.

1.6. Cancerul de sân și ovar ereditar

Există două asemenea sindroame (OMIM + 113705 și OMIM * 600185) care, împreună, sunt răspunzătoare de apariția a circa 2-3% din cancerele de sân și ovar și circa 40% din cazurile cu istoric familial pozitiv. Aceste sindroame au transmitere autozomal dominantă și sunt determinate de mutațiile germinale ale genelor *BRCA1* (cromozomul 17q21) și *BRCA2* (cromozomul 13q12.3). Mutațiile genei *BRCA1* au o frecvență a cărei valoare este cuprinsă între 1/500 – 1/1.000 în populația generală (una dintre cele mai frecvente boli genetice), în timp ce mutațiile genei *BRCA2* au o frecvență încă imprecis apreciată. Riscul dezvoltării unui cancer de sân la femeile purtătoare ale unor asemenea mutații este de 85-90% pe parcursul întregii vieți și de 50% până la vârsta de 50 de ani.

Cancerele mamare apărute la purtătorii unor mutații *BRCA1* diferă de alte forme de cancere de sân prin aceea că sunt, de regulă, carcinoame aneuploide care nu exprimă receptorii pentru estrogen și progesteron și nici amplificarea HER2 (de accea sunt numite cancere triplu-negative). În schimb, ele exprimă adesea citocheratinele 5 și 14, vicentina, EGFR și caderina P (CDH3) fenotipul fiind denumit „cancer mamar tipul bazal". Aceste caracteristici fac dificilă detecția prin mamografie a cancerelor de sân la purtătorii unor mutații *BRCA1*, fapt care obligă la utilizarea RMN. Riscul dezvoltării unor cancere mamare contralaterale pentru purtătorii unor mutații *BRCA1* sau *BRCA2* este de asemenea crescut, situându-se la circa 3% pe an.

Riscul dezvoltării unui cancer ovarian (tipul seros papilifer) este diferit pentru cele două gene: 60% pentru *BRCA1* și 20% pentru gena *BRCA2*. La ambele sexe este crescut ușor riscul dezvoltării cancerelor colorectale. Bărbații purtători ai unei mutații *BRCA1*

sau *BRCA2* au un risc de circa 8% de dezvoltare a unui cancer de prostată. În plus, mutațiile *BRCA2* generează la bărbați un risc de 6% de dezvoltare a unui cancer mamar (ceea ce reprezintă o creștere de peste 100 ori a riscului față de populația generală). În sfârșit, mutațiile germinale ale genei *BRCA2* cresc riscul dezvoltării cancerelor de pancreas, cap și gât, vezica urinară, tract biliar, stomac și a melanoamelor.

Genele *BRCA1* și *BRCA2* au funcții de gene supresoare de tumori. Proteinele codificate de ambele gene sunt implicate în repararea rupturilor ADN bicatenare.

Proteina BRCA1 face parte dintr-un complex multiproteic voluminos numit BASC (BRCA1-*associated genome surveillance*), interacționând în special cu proteinele RAD51 și BARD1. BRCA2 interacționează direct și reglează activitatea RAD51 și PALB2. BRCA1 interacționează, de asemenea, cu ARN polimeraza II, iar prin intermediul domeniului său C-terminal – cu complexe cu activitate de histon dezacetilaze. Ca urmare, pe lângă repararea ADN, BRCA1 are roluri și în reglarea transcripției. Majoritatea mutațiilor *BRCA1* și *BRCA2* blochează producția acestor proteine (deleții, mutații cu producere de codoni stop). Există însă și mutații cu sens greșit localizate în regiuni cu activitate critică, precum mutațiile *BRCA1* localizate în regiunile care codifică domeniul RING sau regiunea BRCT a proteinei ori mutațiile *BRCA2* localizate în regiunea proteinei care interacționează cu proteina PALB2.

Implicarea proteinelor BRCA1 și BRCA2 în repararea rupturilor ADN bicatenare poate fi exploatată terapeutic prin utilizarea unor agenți terapeutici care produc astfel de rupturi, în special în combinații cu agenți care blochează căi alternative de reparare a leziunilor ADN bicatenare, precum inhibitorii PARP1.

Persoanele din familiile cu cazuri multiple de cancer de sân și/sau de ovar trebuie să beneficieze de consult și teste genetice și, în cazul confirmării prezenței unor mutații germinale *BRCA1* ori *BRCA2*, trebuie incluse în programe de supraveghere sau de utilizare a unor măsuri profilactice.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN, 1999) recomandă ca femeile din aceste familii să înceapă autoexaminarea sânilor la vârsta de 25 de ani, ori cu cel puțin 5 ani mai devreme decât cel mai precoce cancer de sân diagnosticat în familie. Examinarea clinică a sânilor, anual ori semianual, trebuie începută la aceeași vârstă. Pentru *screening*-ul cancerului ovarian se recomandă ultrasonografia transvaginală semianuală ori anuală, împreună cu dozarea markerului CA-125, începând cu vârsta de 25-35 de ani. Sunt încă discutabile o serie de măsuri profilactice chirurgicale cum ar fi mastectomia sau histero-ooforectomia. Modelele teoretice și studiile epidemiologice sugerează că aceste metode de chirurgie profilactică descresc riscul dezvoltării celor două neoplazii, dar nu îl abolesc. Utilizarea chimioprofilaxiei cu Tamoxifen este încă în curs de evaluare.

Pentru bărbații purtători ai unei mutații BRCA2 trebuie recomandate autoexaminarea sânilor, precum și examinarea clinică și mamografia efectuate anual. De asemenea, trebuie efectuat *screening*-ul pentru cancerul de prostată, deși nu este încă foarte clar dacă metodele de *screening* trebuie utilizate pentru aceste cazuri mai precoce decât pentru populația generală.

1.7. Neurofibromatoza familială

Neurofibromatoza tip 1 (OMIM # 162200) sau boala von Recklinghausen este o boală genetică cu transmitere autozomal dominantă determinată de mutații ale genei supresoare de tumori *NF1* de pe cromozomul 17q11.2. Incidența bolii este de 1 la 3.500 indivizi, jumătate din cazuri fiind determinate de mutații moștenite de la unul dintre părinți și jumătate de mutații *de novo*. Principalele manifestări clinice sunt petele cutanate *café-au-lait*, efelidele axilare și inghinale, neurofibroamele cutanate și subcutanate, neurofibroamele plexiforme, glioamele nervilor optici, nodulii Lisch (macule hiperpigmentate la nivelul irisului care nu afectează acuitatea vizuală) și displazia osoasă. Penetranța bolii este de aproape 100% până la vârsta de 20 de ani, dar expresivitatea este variabilă, chiar și între membrii familiei purtători ai aceleiași mutații. Acest aspect este important pentru sfatul genetic, deoarece un individ cu o formă clinică moderată de boală poate avea descendenți cu forme mai severe sau *viceversa*.

Diagnosticul clinic al bolii este bazat pe criteriile NIH (*National Institute of Health*) care presupun prezența a două sau mai multe dintre următoarele semne clinice: 1. șase sau mai multe pete *café-au-lait* (> 5mm înainte de pubertate sau > 15 mm după pubertate); 2. două sau mai multe neurofibroame de orice tip sau unul ori mai multe neurofibroame plexiforme; 3. efelide axilare sau inghinale; 4. glioame optice; 5. doi sau mai mulți noduli Lisch; 6. displazia osului sfenoid sau displazia ori subțierea cortexului oaselor lungi; 7. o rudă de gradul unu cu NF1.

Gena *NF1* este o genă mare (peste 300 kb ADN genomic cu 60 de exoni) și codifică o proteină numită **neurofibromina**. Această genă are una dintre cele mai crescute rate de mutații spontane de la nivelul întregului genom uman. De aceea, mutațiile care produc boala sunt extrem de variate și pot consta în deleții, inserții, mutații cu substituții ale unor aminoacizi ori cu codon stop sau mutații ce afectează matisarea normală a exonilor. Neurofibromina este exprimată în numeroase tipuri de celule, dar în principal în neuroni, celulele gliale, celulele Schwann și în etapele precoce ale dezvoltării melanocitelor. Neurofibromina este un reglator al activității GTPazice a Ras și, ca urmare,

controlează procesele de proliferare şi diferenţiere celulară.

Diagnosticul molecular este posibil în prezent însă, ca urmare a dimensiunii crescute a genei şi a lipsei unor mutaţii frecvente, implică un protocol complex. O abordare comprehensivă începe cu un test al proteinelor trunchiate, urmat de analize FISH, secvenţiere, RT-PCR, Southern blot şi/sau analize citogenetice. Această abordare permite identificarea a peste 95% dintre mutaţii la pacienţii testaţi. Cu toate acestea, diagnosticul molecular nu este inclus în managementul de rutină al pacienţilor cu NF1 la care diagnosticul clinic este cert. În schimb, diagnosticul molecular este de ajutor la pacienţii suspectaţi a avea boala (de exemplu un copil cu multiple pete *café-au-lait*, dar fără alte semne clinice care să permită diagnosticul pe baza criteriilor NIH), sau atunci când se doreşte folosirea diagnosticului prenatal sau preimplantatoriu.

Una dintre limitele testării genetice în NF1 este lipsa corelaţiilor genotip-fenotip. Ca urmare, un test pozitiv nu poate predicta, de regulă, severitatea bolii. Există însă două excepţii. Prima este produsă de pierderea completă a genei *NF1* alături de alte gene vecine (microdeleţii) care este întâlnită la 4-5% dintre pacienţi. În aceste cazuri pacienţii prezintă un număr foarte mare de neurofibroame voluminoase, afectarea severă a funcţiilor cognitive, mâini şi picioare mari, dismorfism facial, şi au un risc crescut de dezvoltare a unor neoplazii maligne ale nervilor periferici în cursul vieţii. A doua excepţie este deleţia a trei perechi de baze la nivelul exonului 17 cu păstrarea cadrului de lectură. La aceşti pacienţi sunt absente neurofibroamele cutanate, iar riscul complicaţiilor severe este redus.

Neurofibromatoza tip 2 (OMIM # 101000) este un sindrom cu neoplazii multiple care rezultă prin mutaţii ale genei supresoare de tumori *NF2)* de pe cromozomul 22q12. Boala este transmisă autozomal dominant cu penetranţă aproape completă până la vârsta de 60 de ani şi are o incidenţă de 1 la 25.000 de nou-născuţi.

Pacienţii sunt predispuşi la dezvoltarea de leziuni ale sistemului nervos, leziuni oculare şi cutanate. Schwannoamele bilaterale ale nervilor vestibulari sunt tumorile cele mai frecvente şi mai caracteristice pentru boală (90-95% dintre pacienţi), dar ele pot apărea şi la nivelul altor nervi cranieni, spinali sau periferici. Alte tumori ale sistemului nervos asociate cu această boală sunt meningioamele (45-58%), ependimoamele, astrocitoamele şi, mai rar, neurofibroamele. Pacienţii pot dezvolta neuropatie periferică independent de prezenţa unor tumori compresive. Anomaliile oculare cele mai frecvente sunt cataractele (60-81%), membranele epiretiniene (12-40%) şi hamartoamele retiniene (6-22%). Tumorile cutanate, îndeosebi schwannoamele, sunt de asemenea o asociere frecventă (59-68%).

Diagnosticul bolii este clinic, cele mai folosite criterii utilizate fiind criteriile Manchester: 1. schwannoame vestibulare bilaterale; 2. istoric familial de boală plus schwannom vestibular unilateral ori două alte leziuni asociate bolii (meningiom, gliom, neurofibrom, schwannom, cataractă); 3. schwannom vestibular unilateral plus două leziuni asociate bolii (meningiom, gliom, neurofibrom, schwannom, cataractă); 4. meningioame multiple plus schwannom vestibular unilateral sau alte două leziuni asociate bolii (meningiom, gliom, neurofibrom, schwannom, cataractă). Mai mult de jumătate dintre pacienţi nu au istoric familial de boală. Debutul bolii se produce, în general, la adulţi tineri (20-30 ani) şi este dominat de surditate produsă de un shwannom vestibular. Pierderea acuităţii auditive este iniţial unilaterală şi poate fi însoţită de tinitus şi tulburări de echilibru. Atunci când boala debutează în copilărie, cele mai frecvente manifestări sunt cel mai adesea scăderea acuităţii vizuale (cataractă), tumorile cutanate sau mononeuropatiile (pareză facială sau la nivelul unui membru).

Gena *NF2* conţine 17 exoni ce codifică o proteină numită merlină, localizată în mod normal la interfaţa dintre membrana celulară şi citoschelet. Rolurile sale în supresia tumorală sunt încă incomplet elucidate, dar par a fi legate de capacitatea sa de a organiza dispoziţia unor proteine membranare (CD44), (implicate în adeziunea intercelulară – integrine, caderine) şi arhitectura citoscheletului (spectrine, actine). Ca urmare a acestor roluri, merlina intervine în reglarea a numeroase căi de semnalizare intracelulară, în special pe căile PI3K şi MAPK, care sunt cruciale pentru promovarea creşterii şi proliferării celulare.

Au fost identificate o serie de corelaţii genotip-fenotip care explică în mare parte heterogenitatea clinică interfamilială. Astfel, mutaţiile constitutive non-sens sau mutaţiile frameshift ce produc proteine trunchiate sunt asociate cu forme severe de boală, în timp ce mutaţiile cu sens greşit sau deleţiile mari sunt asociate cu forme clinice mai uşoare. De asemenea, mutaţiile la nivelul exonilor 1-5 au efecte mai severe comparativ cu mutaţiile localizate în exonii 11-15.

O caracteristică aparte pentru neurofibromatoza tip 2 este frecvenţa crescută a mozaicismului somatic la pacienţii cu mutaţii *de novo*. La asemenea pacienţi boala poate avea uneori caracter localizat. În plus, doar o parte dintre celulele germinale vor fi purtătoare ale mutaţiei *NF2*, ceea ce face ca riscul de transmitere a bolii la descendenţi să fie mult sub 50%. Pe de altă parte, copiii care moştenesc mutaţia de la un părinte cu mozaicism vor avea o formă mai severă de boală decât părintele afectat, deoarece mutaţia va fi prezentă în toate celulele.

Diagnosticul genetic presimptomatic reprezintă o condiţie importantă a optimizării managementului clinic.

Testarea genetică se recomandă a fi inițiată în jurul vârstei de 10 ani deoarece permite inițierea precoce a *screening*-ului RMN pentru detectarea tumorilor la pacienții cu test pozitiv. Identificarea mutației la pacienții cu mozaicism este mai dificilă, dar poate fi obținută în 80-85% din cazuri. Riscul de transmitere a bolii este de 50% la pacienții cu mutații germinale fiind însă redus la 1/8 la cei cu schwannom vestibular bilateral și cu test genetic negativ în sângele periferic; riscul scade la 1/12 în cazul pacienților care prezintă doar schwannom vestibular unilateral.

2. Cancerele familiale

Această formă de predispoziție genetică este asociată cu un risc redus sau moderat de dezvoltare a unor cancere și este întâlnită în special în formele comune de neoplazii maligne (cancere ginecologice sau digestive). Spre deosebire de formele ereditare care se asociază frecvent cu alte modificări fenotipice non-neoplazice, în cancerele familiale singura trăsătură care poate fi recunoscută este agregarea familială, ceea ce face și mai importantă anamneza familială corectă. Studiul acestei forme de predispoziție genetică este important atât pentru implicațiile privind sănătatea publică, cât și pentru posibilitatea identificării unor noi procese relevante pentru dezvoltarea cancerelor.

Identificarea genelor implicate în producerea acestor cancere familiale nu este posibilă prin studii de dezechilibru al înlănțuirii deoarece numărul cazurilor prezente într-o familie este, de regulă, redus. În ultimii ani au fost însă organizate consorții largi care, utilizând metodologii de tipul caz-control, au investigat mii de subiecți. Colecțiile de date au fost utilizate pentru genotiparea a sute de mii de SNP (polimorfisme mononucleotidice) distribuite la scara întregului genom cu scopul identificării alelelor asociate cazurilor de cancer.

Unele dintre mutațiile identificate sunt localizate la nivelul aceloraşi gene implicate în formele ereditare de boală. Cele mai multe sunt localizate însă la nivelul unor gene noi. Relațiile cauzale dintre acești loci nou identificați și patogeneza cancerelor respective nu sunt încă bine înțelese. Mai mult chiar, unele alele nou identificate nu sunt localizate în interiorul unor gene, iar mecanismul prin care cresc riscul de apariție al cancerului rămâne și mai obscur. Un exemplu este acela al celor două SNP din regiunea cromozomială 8q24 care sunt asociate cu un risc semnificativ crescut de dezvoltare a cancerului de prostată (vezi tabelul 18.7). Este interesant și faptul că unele dintre alelele nou identificate par a fi răspunzătoare de creşterea riscului pentru cancer mai ales în anumite populații, cel mai probabil ca urmare a unor efecte de fondator.

3. Cancere cu predispoziție genetică fără istoric familial

Deşi considerate în cea mai mare parte rezultatul intervenției factorilor de mediu, majoritatea cancerelor sunt incluse în prezent în categoria bolilor multifactoriale, componenta genetică și cea de mediu având ponderi variabile de la caz la caz.

Studiile de asociere la scara întregului genom (GWAS) au condus în ultimii ani la identificarea a peste 100 de loci cu penetranță scăzută implicați în cancer (tabelul 18.8). Acești loci conțin variante genetice comune care determină doar o creştere modestă a riscului de dezvoltare a cancerelor (de cel mult 1.5 ori mai mare comparativ cu riscul înregistrat în populația generală). Împreună, acești loci produc creşteri cuprinse între 5% (în cazul cancerelor de sân) și 20% (în cazul cancerelor de prostată) față de riscul bazal.

Aproape toți locii identificați în cadrul studiilor GWAS sunt localizați în regiuni genomice care nu fuseseră implicate anterior în cancer. Pentru câteva dintre variantele genetice astfel implicate, cum ar fi *FGFR2* în

Tabelul 18.7. Gene raportate a acționa ca loci cu susceptibilitate redusă-moderată în diverse cancere familiale

Gena	Localizarea cromozomială	Cancerele asociate
Varianta I1307K a genei *APC*	5q21	cancere colorectale (la evreii Aşkenazi)
Varianta E1317Q a genei *APC*	5q21	cancere colorectale
Varianta alelică *BLM*^{Ash}	15q26.1	cancere colorectale (la evreii Aşkenazi)
Mutația cu trunchierea proteinei 1100delC a genei *CHEK2*	22q12.1	cancere de sân (în Olanda și Finlanda)
Mutația S428F a genei *CHEK2*	22q12.1	cancere de sân (la evreii Aşkenazi)
Mutația IVS2+1G→A a genei *CHEK2*	22q12.1	cancere de sân (în populația slavă)
Mutația cu decalarea cadrului de lectură 1592delT a genei *PALB2*	16p12.2	cancere de sân (în Finlanda)
Mutația Q775X a genei *PALB2*	16p12.2	cancere de sân (în Canada)
Mutații cu trunchierea proteinei a genei *BRIP1*	17q22-q24	cancere de sân
rs1447295 și rs16901979	8q24	cancere de prostată

Tabelul 18.8. Exemple de loci asociați cu un risc ușor crescut de dezvoltare a unor cancere comune

Locus	Cromozom	Polimorfism	Frecvență	Cancer	Risc asociat
NEK10/SLCA7	3	rs4973768	46%	sân	1,11
MAP3K1	5	rs889312	28%	sân	1,13
MRPS30	5	rs10941679	24%	sân	1,19
ESR1	6	rs2046210	36%	sân	1,29
FGFR2	10	rs2981582	38%	sân	1,26
LSP1	11	rs3817198	30%	sân	1,07
RAD51L1	14	rs999737	76%	sân	1,06
TOX3	16	rs3803662	25%	sân	1,20
COX11	17	rs6504950	73%	sân	1,05
ITGA6	2	rs12621278	94%	prostată	1,30
THADA	2	rs1465618	11%	prostată	1,18
TET2	4	rs7679673	55%	prostată	1,09
PDLIM5	4	rs17021918	66%	prostată	1,10
JAZF1	7	rs10486567	77%	prostată	1,12
NKX3.1	8	rs1512268	45%	prostată	1,18
CTBP2	10	rs4962416	27%	prostată	1,17
MSMB	10	rs10993994	40%	prostată	1,25
HNF1B	17	rs11649743	80%	prostată	1,28
KLK2/KLK3	19	rs2735839	85%	prostată	1,20
EIF3H	8	rs16892766	7%	colorectal	1,25
BMP4	14	rs4444235	46%	colorectal	1,11
CRAC1	15	rs4779584	19%	colorectal	1,26
CDH1	16	rs9929218	71%	colorectal	1,10
SMAD7	18	rs4939827	53%	colorectal	1,15
RHPN2	19	rs10411210	90%	colorectal	1,15
BMP2	20	rs961253	35%	colorectal	1,12
CLPTM1L	5	rs401681	57%	pulmonar	1,13
BAT3	6	rs3117582	13%	pulmonar	1,24
CHRNA3/CHRNA5	15	rs8034191	33%	pulmonar	1,30

cancerul de sân și *MSMB* în cancerul de prostată, au fost elucidate bazele funcționale ale variantelor de risc. De exemplu, varianta rs2981578 de la nivelul genei *FGFR2* este localizată la nivelul unui situs de legare a factorilor de transcripție Oct1/Runx2 ce este puternic conservat la mamifere. Totuși, pentru majoritatea variantelor genetice, baza funcțională este încă neelucidată, fiind suspectate noi mecanisme de carcinogeneză.

Majoritatea locilor sunt specifici nu unui anumit tip de cancer, ci chiar unor subtipuri specifice de boală (de exemplu, cancere de sân pozitive pentru receptorul estrogenic). Utilitatea clinică a identificării acestor variante în predicția personalizată a riscului de boală este limitată în momentul de față, însă se estimează că acest fapt se va schimba radical odată cu identificarea a noi variante de risc.

E. Noi perspective în diagnosticul și tratamentul cancerelor

Descifrarea substratului molecular al unor cancere a permis dezvoltarea unor metode noi de depistare a neoplaziilor maligne, de evaluare a prognosticului și răspunsului la tratament, precum și elaborarea primelor metode de terapie specifice, cu rezultate clinice îmbucurătoare.

Printre metodele de depistare precoce figurează dozarea unor *markeri moleculari* cu specificitate de organ. Așa sunt PSA (antigenul prostatic specific) în cancerul de prostată sau o serie de antigene carbohidrat (CA): CA125 (cancerele ovariene, cervicale și endometriale), CA27.29 și CA15-3 (cancerul mamar), CA19-9 (cancerele de colon și ducte biliare), CA195 (cancerele pancreatice) etc. Identificarea *translocațiilor cromozomiale* care sunt răspunzătoare de producerea hemopatiilor maligne a permis dezvoltarea unor metode de diagnostic și urmărire a răspunsului la tratament bazate pe dozarea specifică a ARNm himeric. În sfârșit, dozarea nivelului de exprimare a *receptorilor estrogenici și progesteronici* în cancerele mamare permite predicția răspunsului la tratamentul hormonal, în timp ce identificarea amplificării ERBB2 (în cancerele mamare) sau MYCN (în neuroblastoame) este asociată cu un prognostic rezervat.

Un exemplu de tratament specific este utilizarea **acidului retinoic** la pacienții cu leucemie acută promielocitară al cărei substrat molecular îl constituie

apariția unei fuziuni între gena pentru receptorul alfa al acidului retinoic și oncogena PML.

Tratamentul cu **anticorpi monoclonali** a devenit o realitate în cazul bolilor limfoproliferative și al unor tumori solide. Câteva exemple sunt: utilizarea de anticorpi monoclonali față de antigenul CD20 exprimat de limfoamele non-Hodgkin derivate din celulele B (Ibritumomab tiuxetan – Zevalin), anticorpi monoclonali față de antigenul CD52 exprimat pe suprafața limfocitelor T în leucemiile limfocitare cronice (Alemtuzumab – Campath) sau anticorpi monoclonali față de antigenul CD33 în leucemia mieloidă acută (Gemtuzumab ozogamicin – Mylotarg). Toate aceste terapii permit obținerea unor răspunsuri clinice exceptate de efecte toxice secundare. Au fost, de asemenea, construiți anticorpi monoclonali împotriva proteinelor codificate de unele oncogene. Un alt exemplu elocvent este cel al anticorpului față de produsul oncogenei ERBB2 (HER2/neu) amplificată în numeroase cancere de sân. Utilizarea acestui anticorp (Transtuzumab – Herceptin) permite obținerea unui răspuns clinic în forme avansate de cancer. Cetuximab (Erbitux) este un anticorp împotriva EGFR, utilizat cu succes în cancerele colorectale, în timp ce Bevacizumab (Avastin), un anticorp monoclonal împotriva VEGF are aplicații în tratamentul cancerelor colorectale și pulmonare.

Pe lângă anticorpii monoclonali a fost obținut și o baterie de **molecule mici** care inhibă în mod direct o serie de proteine oncogenice. De exemplu, Imatinib mesylate (Gleevec) inhibă activitatea produsului de fuziune BCR-ABL din leucemia mieloidă cronică (vezi caseta 18.1), dar și PDGFR și KIT în tumorile stromale gastrointestinale și cordoame. Gefitinib (Iressa) și Erlotinib (Tarceva) sunt inhibitori specifici ai EGFR cu eficacitate terapeutică în cancerele pulmonare. Sorafenib (Nexavar) și Sunitinib (Sutent) inhibă VEGFR, PDGFR și FLT3 și sunt utilizați în tratamentul carcinoamelor renale și a tumorilor stromale gastrointestinale.

În sfârșit, o altă direcție majoră este **terapia genică** (vezi capitolul 20). Mijloacele utilizate sunt extrem de variate, dar cercetările în acest domeniu sunt încă într-o etapă incipientă, iar rezultatele clinice – inconsistente.

Bibliografie specifică selectivă

1. Asthagiri AR, Parry DM *et al. Neurofibromatosis type 2.* Lancet 2009; 373:1974-1986.
2. Baylin SB, Esteller M *et al. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer.* Hum Mol Genet 2001; 10:687-692.
3. Bianchi NO, Bianchi MS, Richard SM. *Mitochondrial genome instability in human cancers.* Mutation Research 2001; 488:9-23.
4. Boyd KP, Korf BR, Theos A. *Neurofibromatosis type 1.* J Am Acad Dermatol 2009; 61:1-14.
5. Carmeliet P, Jain RK. *Angiogenesis in cancer and other diseases.* Nature 2000; 407:249-257.
6. Chiang AC, Massague J. *Molecular basis of metastasis.* N Engl J Med 2008; 359:2814-2823.
7. Cotter TG. *Apoptosis and cancer: the genesis of a research field.* Nat Rev Genet 2009; 9:501-509.
8. Croce CM. *Oncogenes and cancer.* N Engl J Med 2008; 358:502-511.
9. Croce CM. *Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer.* Nat Rev Genet 2009; 10:704-714.
10. Duesberg P, Rasnick D. *Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own.* Cell Motility and the Cytoskeleton 2000; 47:81-107.
11. Eng C, Hampel H, de la Chapelle A. *Genetic testing for cancer predisposition.* Ann Rev Med 2000; 52:371-400.
12. Evan GI, Vousden KH. *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.* Nature 2001; 411:342-348.
13. Finn OJ. *Cancer immunology.* N Engl J Med 2008; 358:2704-2715.
14. Foulkes WD. *Inherited susceptibility to common cancers.* N Engl J Med 2008; 359:2143-2153.
15. Frohling S, Dohner H. *Chromosomal abnormalities in cancer.* N Engl J Med 2008; 359:722-734.
16. Hanahan D, Winberg RA. *The hallmarks of cancer.* Cell 2000; 100:57-70.
17. Houlston RS, Tomlinson IPM. *Detecting low penetrance genes in cancer: the way ahead.* J Med Genet 2000; 37:161-167.
18. Joyce JA, Schofield PN. *Genomic imprinting and cancer.* Mol Pathol 1998; 51(4):185-190.
19. Kerbel RS. *Tumor angiogenesis.* N Engl J Med 2008; 358:2039-2049.
20. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. *Genetic instabilities in human cancers.* Nature 1998; 396:643-649.
21. Lynch HT, de la Chapelle A. *Hereditary colorectal cancer.* N Engl J Med 2003; 348:919-932.
22. Marsh DJ, Zori RT. *Genetic insights into familial cancers – update and recent discoveries.* Cancer Lett 2002; 181:125-164.
23. Nevins JR. *The Rb/E2F pathway and cancer.* Hum Mol Genet 2001; 10:699-703.
24. Patel AS, Hawkins AL, Griffin CA. *Cytogenetics and cancer.* Curr Opin Oncol 2000; 12:62-67.
25. Peltomaki P. *Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer.* Hum Mol Genet 2001; 10:735-740.

26. Ponder BAJ. *Cancer genetics*. Nature 2001; 411:336-341.
27. Sharmal S, Kelly TK, Jones PA. *Epigenetics in cancer*. Carcinogenesis 2010; 31:27-36.
28. Varghese JS, Easton DF. *Genome-wide association studies in common cancers – what have we learnt?* Curr Opin Gen Dev 2010; 20:1-9.
29. Vogelstein B, Kinzler KW. *Cancer genes and the patways they control*. Nat Medicine 2004; 10:789-799.
30. Wang J, Hannon GJ, Beach DH. *Cell biology: risky immortalization by telomerase*. Nature 2000; 405:755-756.
31. Weber GF, Ashkar S. *Stress response genes: the genes that make cancer metastasize*. J Mol Med 2000; 78:663-672.
32. Weinberg RA. *Telomeres: Bumps on the road to immortality*. Nature 1998; 396:23-24.
33. Welcsh P-L, King MC. *BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer*. Hum Mol Genet 2001; 10:705-713.
34. Wooster R, Weber BL. *Breast and ovarian cancer*. N Engl J Med 2003; 348:2339-2343.
35. Zhou B-BS, Zhang H *et al. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery*. Nat Rev Drug Discov 2009; 8:806-823.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 19

PROFILAXIA BOLILOR GENETICE

Profilaxia bolilor genetice include un ansamblu de măsuri ce urmăresc cunoaşterea şi evitarea cauzelor bolilor genetice, depistarea persoanelor şi familiilor cu risc genetic crescut şi diagnosticul precoce al persoanelor afectate.

A. Principalele direcţii de profilaxie a bolilor genetice

Profilaxia primară a bolilor genetice urmăreşte evitarea apariţiei acestor afecţiuni şi se realizează prin două mari direcţii de acţiune:

(1) *Prevenirea apariţiei (producerii) şi/sau transmiterii (propagării) mutaţiilor*

- *Cunoaşterea şi evitarea agenţilor mutageni din mediu* (vezi capitolul 7.B.3) ar putea preveni producerea unor mutaţii. Identificarea agenţilor mutageni este posibilă prin intermediul unor *teste de mutageneză* şi aceasta permite evitarea lor prin măsuri adecvate de securitate şi educaţie; din păcate, *un procent important de mutaţii se produc spontan*, ca urmare a unor erori de replicare, a dezaminării citozinei şi a agresiunilor endogene – evenimente ce nu pot fi evitate.
- *Reducerea vârstei reproductive* sub 35-38 de ani la femei şi sub 45 de ani la bărbaţi ar putea reduce riscul producerii unor gameţi cu anomalii cromozomiale (la femei) sau cu mutaţii genice (la bărbaţi).
- *Transmiterea mutaţiilor* la descendenţi ar putea fi influenţată prin: diagnosticul presimptomatic al purtătorilor de mutaţii dominante (înaintea reproducerii lor), depistarea heterozigoţilor (purtători de mutaţii recesive), evitarea căsătoriilor consangvine (care cresc probabilitatea întâlnirii a doi heterozigoţi) şi acordarea sfatului genetic.

(2) *Prevenirea apariţiei bolii la persoanele cu predispoziţie genetică* (vezi capitolul 14.B) poate fi realizată prin:

- cunoaşterea factorilor ce determină predispoziţia genetică la boală;
- identificarea rudelor sănătoase ale bolnavilor care moştenesc genele de predispoziţie;
- evitarea factorilor de mediu care determină transformarea predispoziţiei genetice în boală.

Profilaxia secundară presupune depistarea precoce a bolii şi/sau evitarea complicaţiilor sale. Acest lucru este posibil prin următoarele acţiuni:

(1) *Prevenirea naşterii unui copil cu genotip anormal* în cuplurile cu risc genetic crescut.

- *Contracepţia şi/sau fecundarea* in vitro. Atunci când unul din membrii cuplului este afectat, se poate evita naşterea unui copil bolnav folosind contracepţia voluntară, temporară (mecanică, hormonală) sau definitivă (ligatura de trompe/canale deferente); o soluţie alternativă este fecundarea *in vitro*, folosind în locul gameţilor persoanei afectate gameţi de la un donator sănătos. Această opţiune este uşor realizabilă pentru donarea de spermatozoizi, însă mult mai dificilă pentru donarea de ovule (ce necesită un tratament hormonal de inducţie a ovulaţiei şi prelevarea ovulelor prin puncţie abdominală, după anestezie generală).
- Screening-*ul şi diagnosticul prenatal. Screening*-ul prenatal se realizează de obicei la 16 săptămâni de gestaţie şi mai rar în trimestrul I, la 11 săptămâni – dozând concentraţia unor markeri biochimici în serul matern, care se modifică semnificativ în sarcinile cu fetuşi prezentând defecte de tub neural deschise, sindrom Down sau alte anomalii congenitale. Diagnosticul prenatal se efectuează prin ecografie fetală, analiza (cromozomială sau moleculară) a celulelor fetale (obţinute de obicei printr-o manevră intervenţională: biopsie de vilozităţi coriale,

BCU "I. CREANGĂ" UNIVERSITY LIBRARY

amniocenteză, cordocenteză), sau prin determinări biochimice în lichidul amniotic; se pot obține astfel informații diagnostice importante, în funcție de care se va decide sau nu întreruperea sarcinii.

(2) *Prevenirea manifestărilor bolilor genetice sau ale complicațiilor lor la un copil născut cu o boală genetică.* Acest obiectiv se realizează prin *screening* populațional sau familial care permite depistarea precoce, la naștere sau ulterior în cursul vieții, a persoanelor cu genotip anormal, fără semne clinice de boală sau cu manifestări incipiente.

- Screening-*ul neonatal* se adresează unor boli monogenice relativ frecvente în anumite populații, care *nu pot fi diagnosticate clinic la naștere*, au consecințe severe și sunt costisitor de tratat dacă se intervine tardiv, după apariția manifestărilor clinice; ele trebuie să beneficieze de un tratament care, aplicat presimptomatic ar putea să reducă severitatea bolii. În numeroase țări, *screening*-ul nou-născuților vizează fenilcetonuria și hipotiroidia congenitală.
- Screening-*ul heterozigoților pentru anumite boli* (de exemplu, talasemie, boala Tay-Sachs, fibroza chistică) în anumite grupuri etnice, precum și *screening*-ul familial al unor persoane cu genotip anormal permit adoptarea de măsuri profilactice adecvate.

Aplicarea măsurilor de profilaxie, în cadrul unor *programe naționale* sau regionale, poate contribui la reducerea poverii bolilor genetice. Ele s-au dovedit a fi eficiente și în relația cost-beneficiu, fiind promovate în toate țările (inclusiv în cele în curs de dezvoltare) care au o politică sanitară coerentă și țin cont de recomandările OMS, pentru care bolile genetice sunt o problemă majoră de sănătate publică. Astfel, s-a conturat și dezvoltat rapid domeniul **geneticii comunitare** – o ramură a geneticii medicale care se ocupă de *screening*-ul și prevenirea bolilor genetice în populație.

B. *Screening*-ul populațional al bolilor genetice

Dezvoltarea cunoștințelor despre bolile genetice, testele de diagnostic și posibilitățile lor de tratament au dus la introducerea, în anii '70, a ***screening*-ului populațional** pentru identificarea într-o populație definită a unor persoane cu o anumită boală genetică tratabilă, înaintea apariției manifestărilor clinice, în stadiul presimptomatic.

Screening-*ul populațional* a fost definit ca „identificarea prezumtivă a unei boli sau a unui defect nerecunoscut clinic, prin aplicarea unor proceduri ce pot fi realizate rapid, în scopul sortării persoanelor aparent sănătoase care *probabil au* boala de cele care *probabil nu au* boala" (Mausner și Bahn, 1974). Testele *screening nu sunt menite să asigure diagnosticul definitiv*, ci mai curând să identifice un grup populațional la care vor trebui făcute alte teste diagnostice. Screening-*ul genetic* a fost definit (Academia Națională de Științe a SUA, 1975) ca fiind „căutarea într-o populație a unor persoane cu anumite genotipuri care:

(1) sunt deja asociate cu o anumită boală (de exemplu, screening-*ul neonatal* pentru fenilcetonurie);

(2) pot produce boală la descendenții lor (de exemplu, detectarea purtătorilor sănătoși – a heterozigoților pentru gena talasemiei sau a fibrozei chistice)".

În afara celor două categorii, *screening*-ul genetic poate fi aplicat la membrii unei familii în care există o boală genetică sau cu predispoziție genetică (tabelul 19.1).

Scopul screening-*ului* este recunoașterea precoce a unei boli sau a unui genotip anormal astfel ca, printr-o intervenție precoce adecvată, procesele patogenice să poată fi prevenite sau persoanele implicate să poată lua o decizie reproductivă informată.

Inițial, *screening*-ul genetic era numai *neonatal* și viza fenilcetonuria – o afecțiune în care, după depistarea sa la nou-născuți, o dietă cu conținut redus de fenilalanină putea preveni retardul mental produs de boală; ulterior, *screening*-ul neonatal s-a extins la hipotiroidia congenitală și apoi la alte erori înnăscute de metabolism.

Aproape concomitent s-a introdus *screening*-ul *prenatal* pentru defectele de tub neural (DTN) deschise – prin dozarea alfa-fetoproteinei (AFP) în lichidul amniotic și apoi în serul matern; acțiunea a fost foarte eficientă deoarece, în trei decenii, prevalența DTN a scăzut semnificativ (de circa 30 de ori în Marea Britanie). Determinarea AFP și a altor markeri serici materni a permis, de asemenea, identificarea sarcinilor cu sindrom Down sau cu alte aneuploidii autozomale. *Screening*-ul seric matern și ecografia fetală permit depistarea a circa 3/4 din fetușii cu sindrom Down și a peste 80% din sarcinile cu DTN. În multe țări, *screening*-ul prenatal a devenit o parte importantă a îngrijirii prenatale de rutină.

Screening-ul populațional s-a dezvoltat ulterior prin introducerea depistării în populația adultă a *purtătorilor sănătoși* ai unei mutații pentru una dintre bolile genetice frecvente în populația respectivă (talasemie, sicklemie, fibroză chistică, cancere ereditare etc.); acest lucru este util pentru sfatul genetic acordat cuplurilor de heterozigoți al căror risc de a avea un descendent afectat este de 25%. În acest context, o altă acțiune profilactică eficace o reprezintă ***registrele genetice***, realizate

Tabelul 19.1. Tipuri de *screening* genetic

I. *Screening*-ul populațional	a) *Screening*-ul prenatal	– Vârstă maternă >35 de ani – Alfa feto-proteină anormală în serul matern – Triplu test anormal – Ecografia fetală: semne de alertă
	b) *Screening*-ul neonatal – sânge – urină	 – Fenilcetonurie – Hipotiroidie congenitală ş.a. – Aminoacidopatii
	c) *Screening*-ul heterozigoților în anumite grupuri etnice	– Talassemie, sicklemie – Fibroză chistică – Boală Tay-Sachs
II. *Screening*-ul familial*	– presimptomatic – purtătorii sănătoşi de anomalii cromozomiale echilibrate – heterozigoții în boli recesive: – autozomale – legate de X – premutații	– Boală Huntington, cancer de sân, cancer de colon ş.a. – Translocații – Fibroză chistică – Distrofie musculară Duchenne – Sindrom X fragil ş.a.

* Pe bază de Registre genetice

în Centrele de genetică medicală, ce conțin informații despre bolnavii cu anumite afecțiuni, precum şi despre rudele lor sănătoase cu risc genetic crescut; ele reprezintă o premisă valoroasă pentru inițierea unor acțiuni de diagnostic precoce, prenatal sau presimptomatic postnatal.

În era medicinii genomice se va dezvolta medicina predictivă pe baza *screening*-ului populațional, care va determina *susceptibilitatea individuală* la bolile comune ale adultului, cum ar fi boala coronariană, diabetul zaharat sau cancerul. Va deveni, astfel, posibilă identificarea unor persoane sau grupe de risc la care se vor iniția acțiuni de prevenție primară (de exemplu, dieta, exercițiile fizice ş.a.) sau secundară (detectarea precoce sau intervențiile farmacologice) pentru a preveni boala sau pentru a îmbunătăți starea de sănătate.

În ultimii ani s-au înregistrat progrese însemnate în *screening*-ul populațional prin folosirea unor noi tipuri de teste şi de instrumente: spectrofotometria, fluorometria, determinările imunoreactive, spectrometria de masă, teste moleculare.

1. Principii de *screening* populațional

1.1. Criteriile de screening

Orice program de *screening* populațional trebuie să îndeplinească o serie de criterii care țin de boală, test şi program.

- *Boala* trebuie să fie relativ frecventă în populația-țintă şi să aibă efecte potențiale severe asupra stării de sănătate, efecte ce pot fi prevenite sau ameliorate printr-o intervenție medicală precoce; acest lucru va asigura beneficiul necesar, în măsură să justifice costul programului de *screening*.
- *Testele* trebuie să fie neinvazive, uşor de realizat (eventual prin automatizare), ieftine şi cu o acuratețe ridicată. *Acuratețea* se referă la capacitatea testului de a separa indivizii care au boala de cei care nu o au. Ea implică două componente: sensibilitatea şi specificitatea (determinate prin compararea rezultatelor *screening*-ului cu cele ale testelor definitive de diagnostic; tabelul 19.2):
  - *sensibilitatea* este capacitatea testului de a identifica corect indivizii care *au boala*. Ea se măsoară prin proporția indivizilor afectați la care testul este pozitiv („adevărați pozitivi"); se poate exprima şi prin proporția rezultatelor *fals negative*, adică a cazurilor neidentificate;
  - *specificitatea* este capacitatea testului de a identifica corect subiecții care nu sunt afectați. Ea se măsoară prin proporția indivizilor neafectați la care testul este negativ („adevărați negativi"); se poate exprima şi prin proporția rezultatelor *fals pozitive* (1 – specificitatea), adică a cazurilor neafectate, incorect depistate.

Testele de *screening* sunt – într-un număr foarte redus – 100% sensibile şi 100% specifice, deoarece distribuția valorilor testului în populația bolnavilor se suprapune parțial pe cea observată în populația neafectată. Astfel, un test *screening* –

Tabelul 19.2. Calculul sensibilității și specificității

	Starea de boală	
Test Screening	**Bolnavi**	**Sănătoși**
Rezultate pozitive (+)	a (adevărat pozitiv)	b (fals pozitiv)
Rezultate negative (-)	c (fals negativ)	d (adevărat negativ)
Sensibilitate = a/(a+c)		
Specificitate = d/(b+d)		
Valoare predictivă pozitivă = a/(a+b)		
Valoare predictivă negativă = d/(c+d)		

spre deosebire de un test diagnostic – va identifica incorect unii indivizi din populația testată. De aceea se stabilește o valoare-prag („*cut off*") ce separă indivizii afectați din populație de cei neafectați. Acuratețea testelor pozitive – ori *valoarea predictivă pozitivă* sau proporția testelor pozitive care sunt cu adevărat pozitive – se măsoară prin proporția indivizilor cu test pozitiv care au într-adevăr boala (se calculează prin raportul a/(a+b) din tabelul 19.2). *Valoarea predictivă negativă* – proporția testelor negative care sunt cu adevărat negative – este un alt parametru important ce caracterizează testele de *screening*, deoarece un individ cu un test negativ nu va mai fi urmărit ulterior și va putea, eventual, dezvolta boala dacă a fost în mod greșit încadrat în grupul persoanelor fără risc.

- *Programul* trebuie oferit în mod corect și *echitabil* unui număr cât mai mare de persoane; participarea trebuie să fie *voluntară*, bazată pe o informare completă și ușor de înțeles, care să permită un *consimțământ informat*. Foarte important este ca programul să asigure resursele necesare pentru diagnosticul și tratamentul persoanelor depistate prin *screening*. Costul programului de *screening* trebuie să fie rezonabil și permisibil, iar relația cost-beneficii – corectă. Decizia introducerii unui program de *screening* se bazează pe factori etici, medicali, financiari și politici.

Costurile „măsurabile" includ cheltuielile necesare desfășurării programului de *screening* și costurile îngrijirii/tratamentului pacienților identificați în stadiul presimptomatic[1]. Beneficiile, deseori dificil de evaluat, sunt reprezentate de îmbunătățirea calității vieții pentru pacient și familie plus reducerea costurilor îngrijirii în raport cu cea a pacienților depistați clinic tardiv.

1.2. Tipuri de screening *populațional*

În funcție de populația-țintă și de obiective se pot deosebi mai multe categorii *operaționale* de *screening* populațional (tabelul 19.1).

- Screening-*ul prenatal* urmărește identificarea gravidelor cu risc suficient de mare pentru a justifica aplicarea unor proceduri de diagnostic invaziv care, datorită riscului medical și costului ridicat, nu pot fi aplicate la toate gravidele. Se realizează prin dozarea unor markeri biochimici fetali în serul matern și ecografie fetală pentru a depista fetușii cu defecte deschise de tub neural (și eventual alte malformații congenitale), precum și cei cu sindrom Down (și alte aneuploidii).
- Screening-*ul neonatal* se adresează unor boli monogenice relativ frecvente (fenilcetonuria, hipotiroidia congenitală ș.a.) care nu pot fi diagnosticate *clinic* la naștere, au consecințe severe și sunt costisitor de tratat, dacă se intervine tardiv, după apariția manifestărilor clinice. Ele trebuie să beneficieze de un tratament care să reducă atât severitatea bolii (dacă este început presimptomatic), cât și costurile îngrijirii pacientului (comparativ cu tratamentul început postsimptomatic).
- Screening-*ul purtătorilor sănătoși* ai unei mutații pentru o anumită boală monogenică frecventă într-o anumită populație (talasemie, sicklemie, fibroză chistică etc.)[2] identifică familiile cu risc genetic crescut.

1.3. Serviciile de screening

Realizarea *screening*-ului nu este o problemă tehnică, ci mai ales una *profesională* și *managerială*. Într-adevăr, *screening*-ul se impune a fi realizat de un serviciu integrat, de înaltă calitate (acreditat), care trebuie să asigure patru elemente: management, monitorizare, informare și decizie, pregătire profesională continuă.

- *Managementul serviciului* trebuie asigurat de un medic consultant cu experiență în *screening*, care va avea toate responsabilitățile serviciului. El va fi ajutat de un *coordonator de screening* responsabil de activitatea zilnică. Cei doi coordonatori trebuie

1. Dacă nu sunt disponibile fondurile necesare tratamentului presimptomatic al unei boli, atunci introducerea unui program de *screening* pentru acea boală nu își găsește justificarea.
2. La această categorie se poate atașa *diagnosticul presimptomatic* al purtătorilor sănătoși de mutații patogene prezenți în familia unui bolnav, pe baza unor *registre genetice*.

BCU "ALEXANDRU IOAN CUZA" IAȘI

să lucreze într-o strânsă colaborare şi să ajusteze programul de *screening* şi metodele de furnizare a serviciilor în funcţie de resurse şi necesităţi. Pentru introducerea şi desfăşurarea testării sunt esenţiale *colectarea probelor, infrastructura de laborator şi profesionalismul echipei.*

- *Monitorizarea programului* include evaluarea periodică a performanţelor testelor, a metodelor de laborator şi furnizarea serviciilor prin acţiuni de control de calitate, intern şi extern. În funcţie de datele obţinute se va realiza o ameliorare continuă a programului de *screening.*
- *Informare şi decizie.* Persoanele care ar putea beneficia de *screening* trebuie să fie informate adecvat (oral şi în scris), înainte de efectuarea testului, despre metodele de *screening*, avantajele şi limitele lor (posibilitatea unor rezultate fals negative sau fals pozitive), pentru a lua o *decizie personală informată privind participarea la test.* După efectuare, rezultatele pozitive trebuie transmise imediat de către o persoană care să cunoască bine problemele legate de *screening* şi explicate într-o manieră tonică, relaxantă şi plină de înţelegere. Rezultatele negative se pot comunica prin telefon, cu menţiunea că nu exclud complet ca subiectul să fie afectat. Esenţial este ca subiecţii să înţeleagă faptul că metodele de *screening nu realizează un diagnostic cert*, ci numai o apreciere a riscului.
- *Pregătirea continuă a staff-ului (training)* este importantă pentru a asigura calitatea tuturor etapelor/operaţiunilor (începând de la completarea formelor de solicitare a testului cu date clinice relevante pentru interpretare, metoda de lucru şi terminând cu transmiterea rezultatelor). Periodic, se vor face informări privind controlul de calitate şi performanţele programului în care echipa tehnică este implicată.

1.4. Probleme etice asociate screening-ului populaţional

Toate tipurile de *screening* – prenatal, neonatal, al purtătorilor adulţi – ridică multiple şi delicate probleme etice. Problema esenţială este posibilitatea compromiterii *autonomiei de decizie a* cuplului (în cazul *screening*-ului prenatal) sau a părinţilor (în cazul *screening*-ului neonatal), determinată de *o informare inadecvată* premergătoare testării. La aceasta se poate adăuga o *inechitate în accesul la programele de screening* (în special prenatal), datorită fie limitării resurselor sau distribuţiei lor inegale (fapt ce împiedică efectuarea *screening*-ului întregii populaţii-ţintă), fie unei adresabilităţi inegale, determinată de o informare şi o educaţie sanitară deficitare (a populaţiei, dar şi a medicilor de familie), sau de dificultăţile financiare ale familiei.

- În screening-*ul seric matern prenatal* cuplurile pot *să nu înţeleagă* semnificaţia proporţiilor de rezultate fals pozitive (5%) sau fals negative (10-20%) şi astfel pot fi confruntate cu opţiunile diagnosticului prenatal pe care ele nu le-au luat în considerare. La aceasta se pot adăuga complexitatea interpretării testelor şi dificultăţile în înţelegerea informaţiilor post-testare. Mai există şi o problemă de *costuri* care cresc (cu circa 25%) odată cu numărul mai mare de amniocenteze, necesare pentru validarea testelor serice materne.
- În screening-*ul neonatal*, pentru a reduce rata nedepistării unor cazuri de boală, este necesar un nivel înalt de participare la *screening.* În unele ţări/regiuni participarea la *screening* este obligatorie, dar cele mai multe programe se bazează pe *includerea voluntară* a mamelor în testare. Deseori se alege varianta „*opt-out*": gravidele sunt informate prenatal despre test şi, dacă nu-şi exprimă dezacordul, sunt incluse automat în testare, fără a li se mai cere alt consimţământ. Desigur, din punct de vedere etic, varianta „*opt-in*" este cea mai corectă, deoarece se solicită un consimţământ informat, activ, înainte de efectuarea testului.
- Screening-*ul purtătorilor sănătoşi* se confruntă cu problema *confidenţialităţii* datelor, mai ales faţă de angajatori sau companiile de asigurări.

Vom sublinia, din nou, că programele de *screening* ar trebui oferite în mod echitabil întregii populaţii, participarea ar trebui să fie *voluntară*, bazată pe o informare completă şi uşor de înţeles, care să permită un *consimţământ informat*; persoanele vizate *au dreptul de a alege să nu fie testate.*

2. *Screening*-ul prenatal

Screening-ul prenatal se efectuează prin determinarea concentraţiei unor markeri biochimici fetali[3] în serul matern, care se modifică semnificativ în sarcinile în care fetusul are defecte de tub neural (DTN) deschise, sindrom Down sau alte anomalii congenitale.

2.1. Screening-*ul prenatal al DTN deschise*

Iniţial, *screening*-ul unor markeri din serul matern a vizat DTN[4] prin determinarea *alfa-fetoproteinei* (AFP),

3. Este vorba de proteine produse de făt în cursul perioadei gestaţionale sau hormoni produşi de unitatea feto-placentară.
4. DTN îndeplinesc condiţiile unei boli supuse *screening*-ului deoarece sunt anomalii congenitale relativ frecvente, au consecinţe grave pentru făt şi 95% dintre copiii cu DTN se nasc din gravide fără istoric familial pozitiv.

la 16 săptămâni de vârstă gestațională (VG)[5], care are valori semnificativ mai mari la gravidele cu fetuși ce au DTN deschise.

- AFP este echivalentul fetal al albuminei și principala proteină din sânge în primele stadii ale dezvoltării fetale; treptat, spre sfârșitul perioadei fetale și neonatal, AFP este înlocuită cu albumina. AFP difuzează prin membranele fetale în sângele matern; în mod normal, concentrația AFP în serul matern (AFM-SM) crește treptat, din săptămâna a 10-a până în săptămâna a 32-a de gestație.
- Valorile AFP pentru o anumită gravidă sunt exprimate ca *multiplu al medianei* (*multiple of median – MoM*) pentru sarcinile normale de aceeași vârstă gestațională; *mediana* este valoarea mijlocie a rezultatelor determinărilor AFP efectuate într-o anumită săptămână de vârstă gestațională (într-o populație definită de gravide), aranjate în ordine crescătoare[6]; un *multiplu al medianei* se obține prin divizarea valorii observate la o gravidă cu o anumită vârstă gestațională la valoarea mediană stabilită pentru VG respectivă. De obicei se face o *corecție* a nivelului AFP în raport cu greutatea gravidei (nivelul AFP-SM scade odată cu creșterea greutății materne, datorită diluției AFP în circulația maternă)[7], etnia, prezența diabetului, fumatul și alți factori.
- Orice defect fetal care permite *scurgerea* serului fetal în lichidul amniotic (LA) va produce creșterea semnificativă a AFP în LA și apoi în serul matern[8]. Principala cauză a acestui fenomen este reprezentată de defectele deschise ale tubului neural[9] (țesutul neural este expus direct la exterior sau acoperit de o membrană subțire și transparentă).
- Curbele nivelului AFP-SM în sarcinile normale și anormale se suprapun parțial (figura 19.1); de aceea în practică a fost introdus *un nivel-prag arbitrar* corespunzător percentilului 95 sau multiplului 2,5 al medianei, valoare peste care se poate afirma existența unui risc crescut de DTN.

Screening-ul AFP-SM se practică de obicei la 16 săptămâni de vârstă gestațională (determinată ecografic prin măsurarea DBP). Deși performanțele testului sunt mai mici decât la 17 săptămâni, se are în vedere eventuala întrerupere a sarcinii până la 20 de săptămâni. Circa 1-2% dintre femeile gravide vor prezenta valori crescute ale AFP-SM peste pragul AFP ≥ 2,5 MoM și vor fi supuse *testelor diagnostice* – ecografie și amniocenteză – pentru a se determina nivelul AFP și acetilcolinesterazei în LA.

- *Ecografia fetală* dă rezultate foarte bune dacă este practicată de specialiști cu experiență; anencefalia este practic totdeauna observată; spina bifida se poate identifica combinând examinarea coloanei vertebrale cu semnele craniene: reducerea DBP, semnul „lămâii" (regiunea frontală a craniului fetal este mai „ascuțită", luând formă de lămâie în locul formei normale de ou) și semnul „bananei" (diametrul transvers al cerebelului este redus). În centrele unde ecografia se efectuează de rutină, examenul ultrasonografic ar putea înlocui dozarea AFP-SM pentru *screening*-ul DTN, dar *screening*-ul AFP-SM este mai ușor de aplicat la un număr mare de gravide,

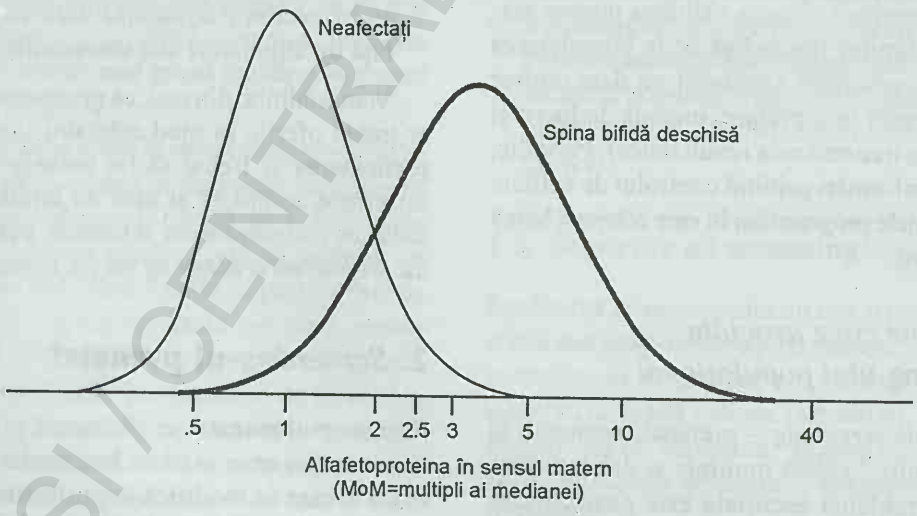


Figura 19.1. Nivelurile alfafetoproteinei în serul matern (AFP-SM), la 16 săptămâni de gestație, la gravidele cu fetus normal și la gravidele cu fetus care are un defect de tub neural deschis
(după Mueller și Young, 1999)

MoM – multiplu al medianei

5. VG se determină ecografic, prin măsurarea diametrului biparietal (DBP) a lungimii femurului (LF), a lungimii cranio-caudale (LCC) și a translucenței nucale (TN).
6. *Mediana* este o valoare mai bună decât *media* – deoarece nu este influențată de valori ocazionale.
7. Corecția se face prin divizarea valorilor MoM observate prin valorile MoM așteptate la o anumită greutate maternă.
8. Inițial *screening*-ul DTN deschise s-a făcut prin determinarea radioimunologică a AFP în LA; deoarece nivelul AFP-LA se corelează cu nivelul AFP-SM s-a introdus *screening*-ul serului matern și măsurarea AFP printr-o manevră mai puțin invazivă.
9. DTN închise, acoperite de piele sau o membrană groasă și opacă, nu pot fi detectate prin dozarea AFP.

FOLIA IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

nu necesită operatori antrenați în ecografie și, în plus, dă informații și pentru *screening*-ul sindromului Down (vezi mai jos).

- Amniocenteza și dozarea AFP în LA contribuie la confirmarea diagnosticului la valori de 3,5 MoM, la 16 săptămâni VG; dacă se găsesc valori ≥ 2 MoM (5% dintre gravide), atunci se practică și dozarea *acetilcolinesterazei* în LA, detectându-se astfel 99% dintre toate DTN deschise cu o rată de 0,3% rezultate fals pozitive (determinate în special de contaminarea cu sânge a LA).

Numai 1 din 15 femei gravide cu AFM-SM crescută va avea AFP crescută și în LA. Deci *valoarea predictivă a AFP-SM* este scăzută – de circa 6%. Totuși, *sensibilitatea* AFP-SM[10] este înaltă, permițând identificarea a peste 90% dintre fetușii cu anencefalie și a peste 80% din cazurile de spina bifida deschisă. Dozarea AFP-SM combinată cu ecografia identifică peste 95% din DTN. *Screening*-ul DTN prin determinarea AFP-SM nu are o *specificitate* de 100% deoarece există și alte cauze ce produc creșterea AFP-SM: supraestimarea vârstei gestaționale, sarcinile multiple, fătul mort, iminențele de avort tratate, alte anomalii fetale (defecte ale peretelui abdominal – omfalocel, gastroschizis –, atrezii esofagiene și intestinale, teratoame sacro-coccigiene, extrofie vezicală, sindrom nefrotic congenital, leziuni cutanate și sângerări fetale intrauterine). Cea mai mare parte dintre aceste situații pot fi însă diferențiate de DTN prin ecografie. În ciuda acestor limite, determinarea AFP-SM este larg utilizată și, împreună cu suplimentarea periconcepțională cu acid folic (vezi capitolul 14.B.1), a dus la scăderea semnificativă a incidenței DTN în multe țări.

2.2. Screening-*ul prenatal al sindromului Down*

Inițial, *screening*-ul prenatal al sindromului Down (SD) s-a bazat pe asocierea recunoscută dintre vârsta maternă avansată și boală (Penrose, 1933) și consta în analiza cromozomilor în celulele fetalela gravidele de peste 35 de ani. Cum însă numai circa 5-7% dintre femeile gravide se încadrează în această categorie și numai 25-30% dintre toate cazurile de SD se nasc din mame de peste 35 de ani, sensibilitatea și specificitatea *screening*-ului bazat numai pe criteriul unic al vârstei materne sunt reduse. Ulterior, s-a descoperit că sarcinile cu fetuși care au SD se asociază cu *reducerea AFP-SM, creșterea concentrației serice a gonadotrofinei corionice umane (HCG)* și *scăderea estriolului neconjugat (uE3)* în serul matern[11]; acești trei markeri serici au fost asociați în ***triplul test*** care, depistând circa 60-70% dintre sarcinile afectate, a fost introdus după 1990 în practica de rutină a îngrijirii prenatale în multe țări ale lumii.

a) Screening-*ul seric la 16 săptămâni de sarcină*

În mod normal, în trimestrul II de sarcină nivelul seric matern al AFP și uE3 crește o dată cu vârsta gestațională, iar cel al HCG total scade. În SD, acești markeri, exprimați ca multiplu al medianei (MoM) (vezi mai sus), se modifică semnificativ: AFM și uE3 scad cu aproximativ 25%, iar valoarea HCG se dublează[12] (figura 19.2). Sigur, nici unul dintre cei trei markeri serici nu este în măsură să asigure o discriminare absolută. Asocierea lor în **triplul test**, posibilă deoarece acești markeri variază în mod independent unul de altul, permite identificarea, atunci când pragul de risc este fixat la 1:270, a circa 67% din cazurile de sindrom Down pentru un procent de teste fals pozitive de 5%. Testul este considerat pozitiv dacă valoarea este ≥ 1:270, în acest caz propunându-se efectuarea examenului citogenetic al celulelor fetale obținute prin amniocenteză. Valorile situate în limitele normale reduc probabilitatea ca fetusul să fie trisomic, fără a o exclude însă.

Performanțele triplului test în SD pot fi sporite până la 70-80%, dacă se măsoară și fosfataza alcalină rezistentă la uree a neutrofilelor (triplul test plus), sau subunitățile libere α și β ale HCG. Recent, a fost identificat un al patrulea marker seric – *inhibina A* –, care la 16 săptămâni de sarcină are un nivel de 1,8 MoM în sarcinile cu SD; astfel, **quadruplul test** (AFP, uE3, HCG și inhibina A sau βHCG) identifică la această vârstă gestațională circa 79% dintre fetușii cu SD, cu o rată de 5% rezultate fals pozitive.

Triplul test – efectuat la 16 săptămâni de sarcină – furnizează informații utile nu numai pentru evaluarea riscului nașterii unui copil trisomic, ci și pentru depistarea altor anomalii fetale (vezi tabelul 19.3).

10. Deși sensibilitatea AFM-SM este mai mică decât a AFM-LA, riscurile determinării AFM-SM sunt nule.
11. HGC este un hormon glicoproteic alcătuit din două subunități neidentice – a și b – aflate fie libere, fie cuplate între ele; HGC este produsă de sincițiotrofoblastul placentar și excretată direct în sângele matern. Estriolul neconjugat este un hormon steroid secretat de unitatea fetoplacentară. Nivelurile crescute ale HCG sunt sugestive pentru boala trofoblastică (sarcina molară). uE3 are ca substrat dehidroepiandrostendionul secretat de suprarenalele fetale și este metabolizat de placentă, care îl transformă în estriol. Scăderea uE3 indică suferință fetală, ceea ce impune întreruperea de urgență a sarcinii. Valorile inferioare MoM sunt asociate cu SD și cu hipoplazia suprarenaliană și anencefalia.
12. Valorile medii ale celor trei markeri în sarcinile cu SD, exprimate ca multipli ai MoM din sarcinile normale (la care prin definiție MoM este 1,0) sunt: AFP – 0,75; uE3 – 0,73; HCG – 2,05; ca și în cazul DTN se vor face o serie de corecții ale valorilor observate funcție de VG, greutate maternă, imaturitate fetală, fumat etc.

Tabelul 19.3. Variațiile markerilor serici materni în diferite afecțiuni fetale

Afecțiunea fetală	Nivelul markerilor serici materni		
	AFP	Estriol neconjugat	*HCG*
Spina bifida deschisă, defecte ale peretelui abdominal	crescut	normal	normal
Anencefalie	crescut	redus	normal
Hiperplazie corticosuprarenaliană congenitală	normal	foarte redus	normal
Sindromul Down, sindromul Turner cu higroma chistică	redus	redus	crescut
Trisomia 18	redus	redus	redus
Monosomia X fără higroma	normal	redus	redus
Sarcina molară	normal	redus	redus
Moarte fetală	crescut	redus	redus

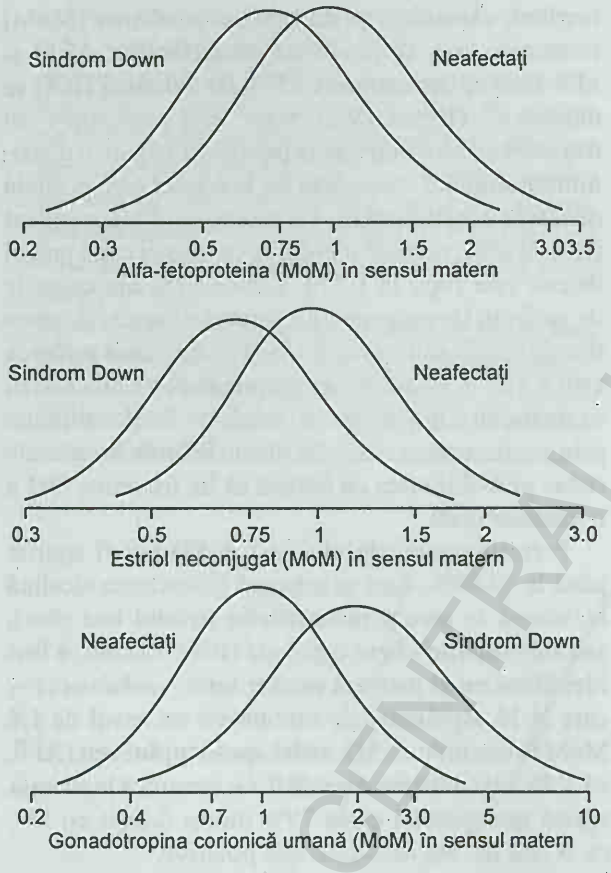


Figura 19.2. Distribuția nivelului seric matern (în MoM) al AFP, estriolului neconjugat și gonadotropinei corionice umane, la 15-20 săptămâni de sarcină, la gravidele cu fetuși normali și cu fetuși cu sindrom Down
(după Wald și Kennard, 1996)

Intervalul optim pentru efectuarea triplului test este cuprins între săptămânile 15 și 18 de sarcină, cel mai bine la 16 săptămâni. Nivelurile serice ale markerilor utilizați în evaluarea riscului nașterii unui copil afectat sunt influențate de mai mulți factori:

- vârsta gestațională (care trebuie stabilită cu exactitate prin examen ecografic);
- greutatea gravidei;
- diabetul insulino-dependent (tip 1) matern;
- sarcina multifetală;
- istoricul familial de trisomii sau defecte de tub neural;
- numărul de țigări fumate zilnic;
- grupul etnic căruia îi aparține gravida.

Prelucrarea computerizată a valorilor biochimice raportate la factorii menționați stabilește magnitudinea riscului. În sindromul Down, de pildă, limita acceptată (*cut off*) este de 1:270 (corespunzătoare riscului de trisomie 21 al gravidelor de 35 de ani, dar inferioară riscului de avort consecutiv amniocentezei).

Ținând cont de performanțele și mai ales de limitele *screening*-ului serului matern, părinților trebuie să li se explice foarte clar faptul că *triplul test este numai un test de screening* și nu unul de diagnostic. Gravidele la care rezultatele triplului test sunt pozitive trebuie supuse unui examen ecografic efectuat cu aparatură de înaltă rezoluție, de către experți în medicina fetală. Se impune a fi subliniat faptul că rezultatele celor două tipuri de investigații – biochimice și ecografice – au doar o valoare orientativă. Diagnosticul prenatal de certitudine se stabilește exclusiv prin examinarea citogenetică a celulelor fetale obținute prin metode invazive.

b) Screening-*ul sindromului Down la 8-14 săptămâni de sarcină*

Testele de *screening* și diagnostic prenatal ale SD efectuate în trimestrul al doilea de sarcină au dezavantajele traumei psihologice și ale dificultăților obstetricale de întrerupere a cursului sarcinii. Ambele inconveniente pot fi depășite prin introducerea unor teste de *screening* ale SD în trimestrul I.

Examenele biochimice, în special cele care evidențiază scăderea concentrației *proteinei plasmatice A asociată cu sarcina (PAPP-A)* și creșterea nivelului

seric al subunității beta libere a HGC[13], sunt capabile să detecteze, încă din săptămânile 8-9 de sarcină, circa 60% din sarcinile cu fetuşi având trisomie 21 (la un nivel de risc de 1:300). Performanțele *screening*-ului la 10 săptămâni de sarcină sunt aproape similare cu cele obținute cu triplul test la 16 săptămâni, dar inferioare quadruplului test. Rezultatele pot fi însă substanțial ameliorate prin cercetarea unui marker ecografic: translucența nucală ≥ 3 mm (şi, eventual, absența osului nazal).

Cea mai înaltă rată a detecției şi, totodată, cea mai joasă rată a rezultatelor fals pozitive, se obțin prin combinarea datelor furnizate de examenul ecografic (translucența nucală) şi de măsurarea nivelului PAPP-A, efectuate în primul trimestru (săptămânile 10-14), cu valorile markerilor trimestrului doi (AFP, uE3, beta HCG liberă sau totală, inhibina A), la care se adaugă şi vârsta gravidei. Analiza combinată a rezultatelor celor două categorii de investigații (trimestrul I şi trimestrul II) este definită prin termenul **„test integrat"**.

Detecția precoce are însă şi dezavantaje. Acestea includ:

- obligativitatea stabilirii ecografice a vârstei gestaționale;
- riscurile crescute ale biopsiei de vilozități coriale efectuată în primul trimestru pentru confirmarea citogenetică a diagnosticului;
- sensibilitatea mai redusă a testelor;
- imposibilitatea obținerii unor date suplimentare (de exemplu, detectarea DTN) prin dozarea AFP, care nu are valori semnificativ modificate în trimestrul I de sarcină;
- costurile mai ridicate în cazul în care rezultatele sunt incerte şi investigațiile urmează a fi repetate în al doilea trimestru;
- *screening*-ul precoce se dovedeşte a fi inutil în cel puțin 20% din cazuri, această cifră reprezentând proporția fetuşilor afectați care sunt avortați spontan între săptămânile 10 şi 16 de sarcină.

Cu toate acestea, *screening*-ul biochimic şi ecografic al SD în primul trimestru de sarcină cunoaşte o permanentă dezvoltare şi este metoda de primă intenție recomandată în unele țări.

3. *Screening*-ul neonatal

Programele de *screening* a nou-născuților reprezintă o oportunitate ideală pentru depistarea presimptomatică şi prevenirea unor boli genetice. Prima afecțiune pentru care a fost efectuat *screening*-ul neonatal a fost *fenilcetonuria*, o boală relativ frecventă care evoluează natural spre un retard mental profund. Această evoluție poate fi evitată dacă boala este depistată – prin evaluarea fenilaninei în sânge (mai exact, o picătură de sânge colectată de la sugar pe o hârtie de filtru şi apoi uscată) cu ajutorul testului de inhibiție bacteriană descris de Guthrie sau cromatografie – şi tratată imediat după naştere, când sugarul este încă asimptomatic, printr-o dietă săracă în fenilalanină. Demonstrarea succesului testului şi a eficienței tratamentului au dus la introducerea, în multe țări ale lumii, a *screening*-ului neonatal pentru unele boli genetice ca o modalitate utilă de optimizare a sănătății publice.

Aşa cum am precizat, *screening*-ul neonatal se adresează unor boli monogenice relativ frecvente în anumite populații sau grupuri etnice, care *nu pot fi diagnosticate clinic la naştere*, au consecințe severe şi sunt costisitor de tratat, dacă se intervine tardiv, după apariția manifestărilor clinice. Ele trebuie să beneficieze de un tratament care să reducă atât severitatea bolii (dacă este început într-un stadiu presimptomatic), cât şi costurile îngrijirii pacientului (comparativ cu tratamentul început postsimptomatic). Aceste condiții sunt îndeplinite integral de *fenilcetonurie* şi de *hipotiroidia congenitală* şi parțial de *galactozemie*, *deficiența de glucoză-6-fosfat dehidrogenaza* şi *hiperplazia suprarenaliană congenitală* sau de unele aminoacidemii. În prezent, în unele regiuni (centre) sau țări s-a introdus în programele de *screening* neonatal şi depistarea unor afecțiuni genetice frecvente – cum ar fi *fibroza chistică*, *hemoglobinopatiile*, *distrofia musculară Duchenne* (la băieți), *deficiența în α-1-antitripsină* – pentru care nu există încă un tratament eficace, dar care diagnosticate precoce pot fi ameliorate prin tratamente paliative sau care permit un sfat genetic corect, un planning familial şi un diagnostic prenatal la sarcinile următoare[14].

În ultimii ani s-au înregistrat progrese importante în *screening*-ul neonatal prin standardizarea procedurilor de colectare şi procesare a picăturilor de sânge, introducerea unor noi tipuri de teste şi aparate, de obicei automatizate, ce îmbunătățesc sensibilitatea şi specificitatea. Pentru a reduce numărul rezultatelor fals pozitive se foloseşte deja testarea în două etape: în prima etapă se utilizează teste cu sensibilitate şi precizie mai mică, iar în a doua etapă, folosind proba inițială, teste de mare precizie; de exemplu, în

13. Valoarea mediană a PAPP-A în sarcinile cu SD este în jur de 0,43 MoM, iar a β-HCG de 1,79 MoM. Nivelele joase ale PAPP-A în primul trimestru al sarcinii avertizează nu numai asupra riscului unor trizomii 13, 18 şi 21, ci şi asupra riscului unui avort spontan, al restricției creşterii intrauterine, al mortinatalității şi al preeclampsiei.
14. S-a demonstrat că în distrofia musculară Duchenne (circa 1:4.500 nou-născuți de sex masculin) pot fi prevenite prin *screening* peste 15% din sarcinile cu fetuşi afectați, fapt ce conferă programului un raport cost-beneficiu favorabil.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

screening-ul fenilcetonuriei testul Guthrie este urmat de determinarea tirozinemiei.

3.1. Screening-*ul neonatal pentru fenilcetonurie*

Screening-ul nou-născuților pentru fenilcetonurie (PKU) reprezintă primul și cel mai bun exemplu pentru a demonstra eficiența *screening*-ului neonatal în bolile genetice. PKU este o boală autozomal recesivă relativ frecventă (1:13.000 de nașteri), produsă de o deficiență a fenilalanin-hidroxilazei, prima enzimă ce intervine în calea metabolică principală a fenilalaninei. Deficiența acestei enzime duce la creșterea concentrației plasmatice a fenilalaninei și a metaboliților săi, cum ar fi fenilpiruvatul („fenilcetona") și la scăderea tirozinei (vezi capitolul 12.B.1.2). Boala nu poate fi identificată clinic în primul an de viață și netratată evoluează în peste 95% din cazuri spre un retard mental profund, dar care poate fi prevenit prin menținerea fenilalaninei plasmatice la un nivel aproape normal cu o dietă săracă în fenilalanină, începută în primele săptămâni de viață[15]. Există controverse asupra duratei de menținere a dietei, dar este cert faptul că gravidele cu PKU trebuie supuse unui control strict pentru a fi evitate efectele negative ale hiperfenilalaninemiei asupra fetusului.

PKU este detectată la nou-născuți prin măsurarea fenilalaninei în sânge folosind *testul Guthrie* de inhibiție bacteriană. Câteva picături de sânge, recoltate de regulă din călcâi la 2-3 zile după naștere, sunt plasate pe o hârtie de filtru specială; un eșantion din picătura de sânge uscat este plasat pe o placă cu agar și incubat cu o linie de *Bacillus subtillis* care necesită fenilalanină pentru creștere. Măsurarea creșterii bacteriene permite determinarea cantității de fenilalanină în proba de sânge; testele pozitive sunt de obicei repetate și urmate de dozarea cantitativă a fenilalaninei (>20 mg/dl în PKU clasică) și tirozinei în plasmă. Sensibilitatea testului[16] este de circa 95% și specificitatea aproape de 100%. În prezent se folosește cromatografia lichidă înalt performantă (HPLC)

Analizele cost-beneficiu în *screening*-ul PKU sunt foarte favorabile, justificând (singure) cheltuielile pentru infrastructura necesară colectării și testării neonatale (în Marea Britanie, beneficiul net pentru fiecare pacient identificat și tratat a fost calculat la circa 143.000 Ł).

3.2. Screening-*ul neonatal pentru hipotiroidismul congenital*

Hipotiroidismul congenital (HC) este o boală frecventă (circa 1:4.000 de nașteri) produsă de obicei de *agenezia tiroidiană* nongenetică (aport insuficient de iod) și, mai rar, de hipopituitarism sau de defecte genetice în sinteza tiroxinei, și care, netratată la timp, evoluează spre retard mental, hipostatură și facies grosier.

Screening-ul neonatal al HC se realizează, în prezent, prin măsurarea TSH în probe de sânge recoltate în a treia zi de viață. Tratamentul cu tiroxină (în doză suficientă pentru a menține TSH plasmatic la valori normale) previne dezvoltarea simptomelor severe, dar nu exclude total unele deficite neurologice ce pot apărea mai târziu în viață.

Eficiența *screening*-ului neonatal este influențată de HC tranzitoriu la un sugar ce va deveni eutiroidian în câteva luni și mai ales de cazurile în care boala se dezvoltă mai târziu la nou-născuți cu rezultate normale la *screening*. Totuși, analizele cost-beneficiu ale *screening*-ului neonatal al HC sunt foarte favorabile, determinând introducerea sa în toate programele de *screening* neonatal.

3.3. Screening-*ul neonatal pentru fibroza chistică*

Fibroza chistică (FC) a fost inclusă în numeroase programe naționale de *screening* neonatal încă de acum câteva decenii, pe baza strategiei asemănătoare de identificare a nivelelor anormale ale metaboliților cu cea din fenilcetonurie. Primul test de *screening* (introdus în 1979) se baza pe determinarea nivelelor tripsinogenului imunoreactiv (TIR). Specificitatea acestui test s-a dovedit a fi însă redusă. Ca urmare, nou-născuții cu test pozitiv necesitau repetarea TIR la 2-4 săptămâni și, dacă nivelele rămâneau crescute, aceștia erau supuși iontoforezei cu atropină (testul sudorii), metoda standard de diagnostic a bolii.

Identificarea genei *CFTR* și a mutației 508delF a făcut posibilă introducerea testării genetice în cadrul programelor de *screening* neonatal. În prezent *screening*-ul neonatal este practicat la toți nou-născuții în țări precum Australia, Noua-Zeelandă, în 26 țări din Europa și în majoritatea statelor din SUA. Majoritatea acestor programe folosesc o strategie în

15. O excepție importantă este reprezentată de pacienții care au un defect în metabolismul *biopterinei*, care vor urma un tratament diferit.
16. Proporția de 5% rezultate fals pozitive este determinată mai ales de tirozinemii tranzitorii reversibile sau, mai rar, de alte cauze de hiperfenilalaninemie; această proporție poate fi redusă prin retestare la 2-4 săptămâni sau folosind metodele fluorometrice ori, mai recent, spectrometria de masă (care măsoară concomitent și tirozina).

două etape: prima bazată pe determinarea TIR, iar a doua bazată pe testarea genetică.

Deşi există peste 1.300 mutaţii ale genei *CFTR* identificate până în prezent, cele mai multe dintre acestea sunt extreme de rare (adeseori prezente doar în cadrul unei familii) (vezi capitolul 12.B.2). Ca urmare, programele de *screening* se bazează fie doar pe identificarea mutaţiei 508delF (circa 70% din cazurile de boală), fie a unui set de până la 30 dintre cele mai frecvente mutaţii. Pe măsura acumulării cunoştinţelor privind corelaţiile genotip-fenotip, unele dintre mutaţiile incluse în programele de *screening* au început a fi excluse (de exemplu, mutaţia R117H este cel mai adesea asimptomatică); în Anglia numărul mutaţiilor incluse în programele de *screening* pentru FC a fost redus la doar patru.

4. *Screening*-ul populaţional al heterozigoţilor

Screening-*ul heterozigoţilor* (Na) constă în testarea unei populaţii-ţintă pentru identificarea purtătorilor sănătoşi ai unei gene-boală cu risc crescut de a avea copii afectaţi de o boală recesivă gravă; purtătorii depistaţi vor primi apoi informaţii adecvate şi complete despre riscurile şi opţiunile reproductive posibile (inclusiv diagnosticul prenatal).

Criteriile tehnice şi etice pe care trebuie să le îndeplinească programele de *screening* ale purtătorilor sunt următoarele:

- frecvenţa mare a heterozigoţilor în populaţia-ţintă – de obicei, grupuri etnice specifice – pentru a justifica *screening*-ul (tabelul 19.4);
- existenţa unui test ieftin şi precis, cu foarte puţine rezultate fals negative şi fals pozitive;
- cuplurile de heterozigoţi identificate trebuie să aibă acces la sfat genetic şi diagnostic prenatal;
- participarea la *screening* trebuie să fie voluntară, bazată pe un consimţământ informat şi accesibilă tuturor membrilor comunităţii, iar rezultatele strict confidenţiale.

Screening-ul purtătorilor a fost aplicat cu succes pentru *boala Tay-Sachs* (boală lizozomală letală) la populaţiile de evrei Aşkenazi din America de Nord şi pentru *β-talasemie* în Cipru, ducând, în două decenii, la o reducere cu peste 90% a numărului de nou-născuţi cu aceste boli. În contrast, tentativele de *screening* ale *sicklemiei* în comunităţile de afro-americani din SUA au fost mai puţin eficiente, subliniind importanţa consultării, cooperării şi educării populaţiei-ţintă. *Fibroza chistică* este este un alt exemplu de boală genetică pentru care *screening*-ul purtătorilor este posibil. În prezent *screening*-ul este limitat numai la indivizii cu istoric familial pozitiv şi se practică mai ales la femeile gravide sau la cele ce îşi planifică o sarcină (în cazul unui test pozitiv se evaluează şi partenerul de viaţă, iar dacă ambii sunt heterozigoţi, se recurge la diagnosticul prenatal al fetusului).

Screening-*ul purtătorilor* are mai puţine beneficii pentru indivizii cu teste pozitive, iar dacă acţiunile educaţionale nu sunt suficient de ample şi eficiente, poate duce la stigmatizarea lor printr-o imagine negativă despre ei înşişi şi familia lor, sau despre grupul etnic specific căruia îi aparţin. În plus, nerespectarea confidenţialităţii poate duce la probleme de integrare socioprofesională sau de asigurare medicală.

5. *Screening*-ul familial

Screening-ul genetic poate fi aplicat la membrii unei familii în care există o boală genetică sau o predispoziţie genetică (tabelul 19.1) datorită căreia unii indivizi sănătoşi, în special rudele de gradul I, au un risc crescut de a moşteni şi transmite anomalia genetică. Depistarea precoce a acestei anomalii la persoanele cu risc crescut poate contribui la prevenirea bolii sau a complicaţiilor ei, precum şi la luarea unei decizii reproductive informate. Practic, screening-*ul familial* se aplică în următoarele situaţii:

- unele *boli autozomal dominante pleiotrope*, cu expresivitate variabilă sau penetranţă redusă, care se manifestă clinic în a treia sau a patra decadă

Tabelul 19.4. Exemple de programe de *screening* ale heterozigoţilor

(modificat după Jorde *et al.*, 1999)

Boală	Grup etnic	Frecvenţa heterozigoţilor	Frecvenţa cuplurilor cu risc
Boala Tay-Sachs	Evrei Aşkenazi	1/30	1/900
β-Talasemia	Ciprioţi, greci, italieni	1/30	1/900
α-Talasemia	Asiatici (sud-est), chinezi	1/25	1/625
Sicklemia	Afro-americani	1/12	1/150
Fibroza chistică	Europeni (nord-vest)	1/25	1/625

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de viață (boala polichistică renală AD, hipercolesterolemia familială, polipoza adenomatoasă familială, boala Huntington ș.a.) sau mai precoce, dar oligosimptomatic (neurofibromatoza, scleroza tuberoasă, sindromul Marfan ș.a.); în multe dintre aceste cazuri este posibil un *diagnostic presimptomatic*;

- *rudele sănătoase ale bolnavilor cu unele afecțiuni recesive autozomale* (de exemplu, fibroza chistică) sau legate de X (de exemplu, distrofia musculară Duchenne) care au un risc crescut de a fi purtătoare ale genei mutante și de a avea un descendent afectat, dacă și partenerul de cuplu se dovedește a fi heterozigot (situație frecventă în anumite populații și pentru anumite boli); în aceste cazuri, testarea genetică a partenerului de cuplu și/sau a produsului de concepție (diagnostic prenatal) permite alegerea celor mai bune opțiuni pentru familie;
- în unele *boli provocate de expansiunea repetițiilor trinucleotidice* (vezi capitolele 7 și 12), în special sindromul X fragil, se pot identifica printre rudele sănătoase ale bolnavilor persoanele cu *premutație*, cărora li se poate acorda un sfat genetic corect;
- în multe dintre *bolile comune ale adultului*, inclusiv diferite forme de cancer, se pot determina persoanele sănătoase cu *predispoziție genetică* la boală; în epoca medicinii genomice, se prefigurează dezvoltarea *screening*-ului populațional pe direcția *medicinii predictive* și *identificării indivizilor susceptibili*, vulnerabili, la anumite boli comune;
- rudele apropiate ale purtătorilor sănătoși de *anomalii cromozomiale echilibrate* pot moșteni anomalia și pot avea descendenți anormali, cu monosomii sau trisomii parțiale (vezi capitolul 11).

Aceste situații variate pot fi abordate în centrele de genetică medicală pe baza unui *registru genetic* al indivizilor și familiilor afectate.

5.1. Diagnosticul presimptomatic

În unele boli monogenice cu debut clinic tardiv sau cu penetranță redusă se poate stabili dacă o persoană sănătoasă, dar cu risc (de exemplu, o rudă de gradul I a unui bolnav cu o afecțiune autozomal dominantă), a moștenit sau nu gena mutantă, *înainte ca semnele sau simptomele bolii să devină manifeste.*

Diagnosticul presimptomatic se poate face în unele boli prin evaluare imagistică – de exemplu RMN, CT, ecografie în ADPKD sau scleroza tuberoasă – sau prin alte investigații speciale (EMG, examene oftalmologice ș.a.), alteori prin studii biochimice (de exemplu, hipercolesterolemia familială, hemocromatoza) și, cel mai frecvent și mai sigur, prin analiza ADN (de exemplu, boala Huntington, distrofia miotonică, neurofibromatoza etc.). De subliniat că rezultatele normale la explorările paraclinice și biochimice *nu exclud diagnosticul bolii*, dar reduc considerabil probabilitatea ca persoanele respective să fi moștenit gena mutantă. Numai analiza ADN permite de cele mai multe ori un diagnostic de certitudine.

Decizia testării genetice a persoanelor cu risc crescut va aparține *numai celor direct implicați*; în cazul copiilor, este preferabilă amânarea investigațiilor până după 18 ani, dacă stabilirea unui diagnostic precoce nu oferă beneficii medicale. Oricum, decizia nu este simplă, deoarece un diagnostic pozitiv schimbă radical viața pacientului. Din păcate, în unele afecțiuni nu există un tratament eficace și acest lucru influențează enorm luarea deciziei. Astfel, în boala Huntington – după ce testarea genetică a devenit disponibilă – numai 20-25% dintre persoanele cu risc au optat pentru testare. O situație asemănătoare se întâlnește în cancerele de sân sau de colon ereditare în care, la persoanele cu teste pozitive, evaluările periodice (mamografie sau colonoscopie) pot detecta precoce o tumoră, cu șanse mari de a beneficia de o terapie adecvată, dar nu o pot preveni; nici eventuala îndepărtare chirurgicală a organului (de exemplu, mastectomie) nu elimină complet riscul de cancer. În alte afecțiuni (de exemplu, ADPKD sau hemocromatoză), diagnosticul precoce poate îmbunătăți managementul pacientului, starea lui de sănătate și poate, de asemenea, preveni eventualele complicații.

Există însă două beneficii indiscutabile:

- o persoană cu risc la care testele genetice se dovedesc negative are șansa *evitării traumelor psihice* determinate de incertitudinea privind apariția bolii, precum și a altor proceduri de diagnostic, de cele mai multe ori dificile și/sau scumpe;
- o persoană la care diagnosticul genetic confirmă prezența mutației poate lua *o decizie reproductivă informată*, evitând transmiterea mutației la copiii săi.

Cert este că oricărei persoane cu risc crescut căreia i se oferă alternativa diagnosticului presimptomatic trebuie să i se asigure atât informații detaliate și clare, cât și o susținere psihologică importantă. La acestea se adaugă confidențialitatea deciziei și a rezultatelor.

Tabelul 19.5. Boli ce pot fi incluse în registrele genetice

Boala genetică	Localizarea cromozomială
Boli autozomal dominate	
Boala polichistică renală AD	16, 4
Boala Huntington	4
Cancerul colorectal nonpolipozic ereditar	2, 3 17, 13
Cancerul de sân ereditar	19
Distrofia miotonică	2
Hipercolesterolemia familială	11, 10
Neoplazia endocrină multiplă	1, 5, 8, 9, 17
Neuropatia senzorială şi motorie ereditară de tip I	17, 22 5
Neurofibromatoza I şi II	13
Polipoza de colon	15
Retinoblastomul	9, 16
Sindromul Marfan	3
Scleroza tuberoasă	
Sindromul Von Hippel-Lindau	
Boli autozomal recesive	
Hemocromatoza ereditară	6
Fibroza chistică	7
Talasemia	11, 16
Sicklemia	11
Boli legate de X	
Distrofia musculară	X
Duchenne/Becker	X
Sindromul X fragil	X
Hemofilia	X
Retinita pigmentară	
Anomalii cromozomiale echilibrate	
Translocaţii şi inversii	

5.2. Registrele genetice

Cele mai multe servicii de genetică medicală înregistrează persoanele cu anumite afecţiuni şi datele lor familiale, deci şi rudele sănătoase cu risc genetic, într-o bază de date denumită *registru genetic*. Bolile ce vor fi incluse în registrele genetice trebuie să fie frecvente, cu consecinţe potenţiale severe, dar care să poată fi prevenite sau tratate, şi care să genereze riscuri de recurenţă importante la alţi membri ai familiei (tabelul 19.5). Includerea unor persoane şi familii în registre trebuie să fie *voluntară* şi să asigure *confidenţialitatea* datelor, care nu pot fi folosite fără *consimţământul* participanţilor.

Funcţiile profilactice ale unui registru genetic sunt:

- asigurarea unei legături permanente, bilaterale şi de durată între unitatea de genetică medicală şi familie, pentru a permite nu numai coordonarea unui management corect şi performant al bolnavilor şi rudelor cu risc, ci şi asigurarea unui suport psihologic adecvat;
- determinarea stării de purtător (în bolile recesive) sau realizarea unui diagnostic presimptomatic (în bolile dominante cu debut tardiv) şi prenatal atunci când acestea sunt solicitate;
- asigurarea implementării unor noi tehnologii şi tratamente odată ce acestea devin disponibile.

Practic, un registru genetic funcţional poate contribui decisiv la ameliorarea calităţii vieţii indivizilor şi familiilor cu risc de boli genetice severe, precum şi la prevenirea lor.

C. Diagnosticul prenatal

În anul 1966, Steele şi Berg au arătat că se poate determina constituţia cromozomială a fetusului prin cultura şi analiza celulelor obţinute din lichidul amniotic. Această metodă a deschis calea diagnosticului prenatal (DPN) la gravidele care, datorită vârstei reproductive avansate, aveau un risc crescut de a naşte un copil cu sindrom Down. Ulterior, o dată cu perfecţionarea ecografiei şi a testelor genetice, indicaţiile DPN s-au diversificat, iar *cuplurile cu risc genetic sau malformativ crescut* au dobândit o valoroasă *opţiune reproductivă*[17].

> Ele vor putea concepe o sarcină ştiind că prezenţa sau absenţa bolii la fetus poate fi confirmată prin testare. În peste 95% din cazuri, DPN este normal şi, ca urmare, majoritatea cuplurilor/gravidelor cu risc vor primi un sprijin psihologic decisiv. În prezenţa unei anomalii fetale, cuplul parental va decide evoluţia ulterioară a sarcinii, în funcţie de tipul şi gravitatea defectului,

17. Până la introducerea DPN cuplurile cu risc genetic crescut aveau doar posibilitatea asumării riscului sau evitării oricărei sarcini (prin contracepţie sau sterilizare voluntară).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

precum şi a posibilităţilor reale de corecţie prenatală sau neonatală.

Diagnosticul prenatal este un act medical complex, înalt informativ, care permite depistarea a numeroase anomalii congenitale şi boli genetice în cursul vieţii fetale. Acest serviciu este realizat corect numai printr-o strânsă *colaborare multidisciplinară*, în care medicul genetician are un rol esenţial în evaluare, diagnostic şi sfat genetic.

Pentru a evidenţia poziţia-cheie a medicului genetician în cadrul echipei de DPN (alcătuită din obstetricieni, ultrasonografişti, biochimişti, citogeneticieni ş.a.) vom remarca faptul că DPN începe şi, în cazul unui fetus anormal, se sfârşeşte cu *sfatul genetic*.

- Problema esenţială este *identificarea precoce a cuplurilor cu risc* genetic sau malformativ. Această acţiune ar trebui realizată *preconcepţional*, deoarece ar permite un sfat genetic corect şi ar creşte opţiunile cuplului; în plus, ar permite aplicarea biopsiei de vilozităţi coriale şi rezolvarea dilemei unui fetus normal sau anormal în primul trimestru de sarcină. Dacă soluţia optimă a unui sfat genetic preconcepţional nu se poate realiza, atunci ar fi bine ca identificarea sarcinilor cu risc să se facă *precoce în cursul graviditătii*, prin *screening* ultrasonografic („semne de alarmă") sau seric matern (triplu test pozitiv). Din păcate, multe gravide cu risc nu sunt identificate sau nu sunt trimise pentru DPN până la mijlocul trimestrului II, când această acţiune poate fi prea tardivă sau imposibilă.
- Cuplurile/gravidele îndrumate către DPN au nevoie de *informaţii* care să le permită să înţeleagă corect riscul lor genetic şi să accepte sau nu procedura. *Sfatul genetic* al candidatelor pentru DPN trebuie să precizeze:
  - riscul ca fătul să fie afectat;
  - natura şi consecinţele probabile ale afecţiunii;
  - procedurile posibile pentru DPN, cu riscurile şi limitele lor;
  - intervalul de timp necesar pentru a obţine un rezultat;
  - posibilitatea unui rezultat dificil de interpretat;
  - eventualitatea repetării procedurii în cazul unui eşec şi/sau efectuării de noi teste.
- Medicul genetician este cel mai abilitat să interpreteze atât rezultatele testelor citogenetice şi moleculare efectuate pe celulele fetale, cât şi rezultatele testelor biochimice realizate în lichidul amniotic.
- Identificarea unui fetus anormal implică „continuarea" acţiunii de sfat genetic pentru a defini mai precis natura bolii, riscul de recurenţă şi opţiunile viitoare posibile.

Vom mai preciza că numeroase boli genetice nu pot fi încă diagnosticate prenatal (dar în fiecare an noi afecţiuni se adaugă pe lista celor la care DPN este posibil), precum şi faptul că DPN ridică probleme etice, uneori complexe şi emoţionale[18].

1. Indicaţiile diagnosticului prenatal

Diagnosticul prenatal este indicat în situaţiile în care fătul are un risc crescut, mai mare decât cel al populaţiei generale, de a dezvolta o boală genetică, o boală cu o componentă genetică sau determinată de factori de mediu (infecţii virale, teratogeni externi sau boli materne). Riscul crescut este apreciat fie prin prezenţa unor antecedente familiale de boli monogenice sau anomalii cromozomiale, fie prin apartenenţa la o populaţie cu risc crescut definită prin criterii specifice (epidemiologice – frecvenţa unor mutaţii în diferite populaţii – sau biologice – rezultate anormale ale unor analize biologice). Selecţia femeilor gravide pentru efectuarea DPN se bazează pe principiul că probabilitatea ca fătul să prezinte o anomalie trebuie să fie cel puţin egală cu riscul de inducere a avortului prin utilizarea procedurilor invazive de DPN. În prezent, peste 200 de afecţiuni genetice pot fi diagnosticate prin DPN (vezi website-ul *Genetest*) ce pot fi grupate în mai multe indicaţii majore.

(1) Antecedente familiale pozitive pentru boli monogenice cu transmitere mendeliană pentru care *genele şi/sau mutaţiile sunt cunoscute* (vezi tabelul 19.6):

- gena şi/sau mutaţia responsabilă de patologia identificată în familie este cunoscută. În acest caz un diagnostic ţintit poate fi realizat folosind metode directe de diagnostic molecular (vezi şi capitolul 10).
- gena este identificată, însă mutaţiile sunt necunoscute, sau gena este doar localizată într-o regiune cromozomială, fără a fi identificată. În acest caz singura opţiune este diagnosticul molecular indirect a cărui reuşită este dependentă de posibilitatea de a identifica haplotipul asociat alelei mutante (mărimea familiei

18. Întreruperea cursului sarcinii, mai ales pentru un defect mediu sau „tratabil" postnatal, este o dureroasă dilemă personală, care se poate rezuma prin: *„to kill or not to kill!"* (vezi capitolul 21).

BCUPS MEDICINA LIBRARY

Tabelul 19.6. Boli monogenice mai frecvente la care este posibil un DPN prin analiza ADN

Boli monogenice	Nr. OMIM
Autozomal dominante	
Acondroplazia	# 100800
ADPKD	# 173900
Sindromul Marfan	# 154700
Neurofibromatoza tip 1	# 162200
Distrofia miotonică	# 160900
Boala Huntington	# 143100
Autozomal recesive	
Sicklemia	+ 141900
Fenilcetonuria	# 261600
Boala Gaucher (I, II, III)	# 230800
Fibroza chistică	# 219700
Hiperplazia congenitală de suprarenală	+ 201910
Ataxia Friedreich	# 229300
Atrofia musculară spinală	+ 253300
Talasemiile α	# 141800
Talasemiile β	# 141900
Boala Tay-Sachs	+ 272800
Legate de cromozomul X	
Hemofilia A	+ 306700
Sindromul X fragil	* 309550
Distrofia musculară Duchenne	# 310200
Deficiența de ornitin transcarbamilază	# 311250
Adrenoleucodistrofia	# 300100

și prezența de indivizi bolnavi, densitatea și informativitatea markerilor fiind factori ce influențează identificarea haplotipului).

(2) **Antecedente familiale pozitive** pentru boli monogenice pentru care *genele nu sunt cunoscute*. Strategiile de diagnostic depind în acest caz de manifestările patologice:

- *patologie asociind un sindrom malformativ* în care vor fi utilizate metodele de imagerie fetală (ecografie, RMN) a căror eficacitate depinde de tipul, frecvența, specificitatea și momentul de apariție a malformațiilor în cursul dezvoltării embrionare.
- *patologie metabolică* în care dozări ale activității enzimatice pot fi realizate în celulele fetale sau lichidul amniotic.
- *patologie hematologică* sau imunologică în care analize specifice pot fi realizate folosind sângele fetal obținut prin cordocenteză.
- *patologie dermatologică* în care biopsia cutanată realizată prin fetoscopie permite realizarea diagnosticului.

În cazul bolilor cu transmitere recesivă gonozomală, într-o primă etapă se realizează diagnosticul de sex fie prin metode noninvazive (sângele matern), fie prin metode invazive (cariotip sau diagnostic molecular utilizând ADN purificat din celulele fetale). Testele diagnostice specifice sunt indicate numai în cazul în care fătul este de sex masculin (acesta având o probabilitate de 50% de a moșteni alela mutantă).

(3) **Antecedente familiale de anomalii cromozomiale**. Riscul de recurență depinde de tipul de anomalie cromozomială și de gradul de rudenie cu cazul index.

- Trisomia liberă și omogenă (13, 18 sau 21) într-o sarcină anterioară nu determină o creștere semnificativă a riscului de recurență la o sarcină ulterioară în comparație cu riscul corespunzător vârstei materne, la fel ca și aneuploidiile la rude de gradul doi sau trei. În cazul nașterii a doi copii cu trisomie 21 riscul sarcinilor ulterioare crește semnificativ, legat de prezența unui posibil mozaic germinal. Diagnosticul citogenetic utilizând celule fetale obținute prin tehnici invazive este propus în aceste cazuri, de multe ori ca o măsură de siguranță pentru a exclude mozaicismul germinal.
- Anomaliile cromozomiale echilibrate (translocații reciproce, inversii, inserții) pot produce gameți anormali care și pot determina la făt manifestări clinice importante. Riscul unei anomalii cromozomiale la făt depinde de tipul anomaliei parentale și de sexul părintelui purtător (vezi capitolul 11).

Anomaliile cromozomiale la făt pot fi identificate prin diagnosticul citogenetic cu tehnici convenționale sau moleculare, folosind celulele fetale obținute prin tehnici invazive.

(4) **Apartenența la o populație cu risc crescut:**

- Vârsta maternă avansată (tabelul 19.7), *screening*-ul seric matern pozitiv și/sau semnele ecografice „de alarmă". Toate aceste circumstanțe asociază un risc crescut de aneuploidie fetală, fiind recomandat diagnosticul citogenetic.
- Populații cu frecvență crescută a unor mutații autozomal recesive pentru care poate fi realizat un diagnostic molecular direct.
- Rudele de gradul I ale pacienților cu DTN și femeile însărcinate tratate cu valproat pentru epilepsie au un risc crescut pentru spina bifida, justificând supravegherea ecografică și dozarea AFP.
- Agresiuni teratogene în cursul sarcinii: teratogeni exogeni (vezi capitolul 15) sau afecțiuni materne (diabet zaharat, fenilcetonurie);

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Consagvinitatea şi vârsta paternă avansată cresc riscul pentru bolile recesive şi respectiv dominante. Singura opţiune în aceste cazuri este examinarea ecografică pentru a evidenţia eventualele malformaţii fetale asociate.

2. Tehnicile curente de diagnostic prenatal

Spre deosebire de metodele de *screening* prenatal neinvazive şi fără risc fetal aplicate la un număr mare de gravide, pentru a identifica sarcinile cu risc crescut de a fi anormale, tehnicile de diagnostic prenatal necesită manevre invazive (biopsia vilozităţilor coriale, amniocenteza, cordocenteza). Ele presupun prelevarea şi analiza celulelor fetale pentru a stabili – la gravidele selecţionate pe baza riscului genetic şi/sau malformativ crescut – dacă fătul este purtător sau nu al unei mutaţii genice sau cromozomiale şi/sau dacă prezintă modificări biologice compatibile cu o boală familială sau determinată de factori de mediu. La aceste metode, folosite curent în centrele de DPN, se adaugă o serie de *tehnici speciale* (de exemplu, diagnosticul preimplantatoriu) sau, încă, experimentale (de exemplu, selecţia şi analiza celulelor fetale din circulaţia maternă sau analiza ADN fetal liber circulant în sângele matern) folosite în puţine centre profilate (tabelul 19.8).

Indiferent de procedură, tehnicile de DPN trebuie să îndeplinească următoarele condiţii de aplicabilitate:

- *securitatea*, dependentă de experienţa celui ce aplică procedura şi este exprimată prin rata avorturilor imediate sau tardive, consecutive aplicării procedurii;
- *acurateţea*, exprimată prin calitatea rezultatelor;
- *controlul de calitate*, ce se realizează prin utilizarea de proceduri standardizate ce vizează calificarea personalului, funcţionarea echipamentelor şi mai ales respectarea tehnologiilor şi acurateţea rezultatelor.

Testele trebuie efectuate cât mai *precoce*, iar rezultatele se impun a fi obţinute *rapid*, pentru ca în cazul în care gravida este purtătoarea unui fetus anormal aceasta să poată beneficia de avortul selectiv, *în termenul stabilit prin lege*. Desigur, tehnicile de DPN sunt relativ scumpe, dar beneficiile pentru reproducerea şi sănătatea familiilor sunt mari.

2.1. Ecografia fetală

Ecografia este cea mai folosită metodă de vizualizare a fătului (depăşind net radiografia sau RMN), deoarece este fără riscuri pentru mamă şi făt. A fost utilizată ca metodă de diagnostic prenatal încă din 1972, scopul iniţial fiind cel al detectării anencefaliei.

Tabelul 19.7. Incidenţa sindromului Down la nou-născuţi vii şi fetuşi în funcţie de vârsta maternă

	Incidenţă		
Vârsta maternă (ani)	La naştere	La amniocenteză	La BVC
15-19	1/1.250	—	—
20-24	1/1.400	—	—
25-29	1/1.100	—	—
30-34	1/900-1/500	—	—
35	1/385	1/250	1/250
36	1/300	1/200	1/175
37	1/225	1/150	1/175
38	1/175	1/115	1/115
39	1/140	1/90	1/90
40	1/100	1/70	1/70
41	1/80	1/50	1/50
42	1/65	1/40	1/30
43	1/50	1/30	1/25
44	1/40	1/25	1/25
?45	1/25	1/20	1/15

Surse: Gardner şi Southerland (1996); Hsu (1998); Nussbaum *et al.* (2001)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 19.8. Tehnici de diagnostic prenatal

Tehnici de DPN	*Timpul optim* (trimestru de sarcină)	Afecțiuni diagnosticate
Tehnici standard		
1. Tehnici de imagerie fetală[19]		
1) Ecografia fetală	I, II, II	Anomalii congenitale, DTN, displazii scheletice Anomalii SNC, anomalii congenitale
2) Rezonanța magnetică nucleară	I, II	Displazii scheletice, DTN
3) Radiografia fetală	II, III	Anomalii congenitale, genodermatoze
4) Fetoscopia[20]	III	
2. Tehnici biologice[21,22]		Anomalii cromozomiale
1) Tehnici citogenetice	I, II	Boli moleculare (analiza ADN)
2) Tehnici de genetică moleculară	I, II, III	DTN (determinarea AFP), boli metabolice (prin
3) Tehnici biochimice	II, III	analize enzimatice) Boli hematologice
4) Tehnici hematologice	II, III	Boli imunologice
5) Tehnici imunologice	II, III	
Tehnici speciale:		
3. Diagnosticul genetic preimplantatoriu		Anomalii cromozomiale, boli moleculare (analiza ADN)
4. Analiza celulelor fetale din sângele matern	I, II, III	Trisomiile frecvente, unele boli moleculare
5. Analiza ADN fetal liber circulant în sângele matern	I, II, III	Boli moleculare (analiza ADN), anomalii cromozomiale

Capacitatea informativă a investigațiilor ecografice a crescut spectaculos în ultimii ani, odată cu sporirea performanțelor aparaturii și cu formarea experților în medicină fetală.

Informațiile obstetricale oferite de ecografie depind vârsta sarcinii în care este efectuată examinarea.

- În trimestrul I (de obicei la 10±2 săptămâni de amenoree), examenul ecografic stabilește vârsta sarcinii și determină viabilitatea produsului de concepție.
- În trimestrul II (de obicei la 18±2 săptămâni), ecografia permite diagnosticul gemelarității, determinarea poziției placentei și a vârstei gestaționale – prin măsurarea diametrului biparietal și a lungimii femurului – precum și evidențierea unor anomalii morfologice fetale.
- În trimestrul III (de obicei la 32-34 de săptămâni), investigațiile ecografice permit determinarea dimensiunilor și poziționării fătului, aprecierea ratei creșterii și a intensității mișcărilor fetale, determinarea sexului, evidențierea anomaliilor de volum ale lichidului amniotic, evidențierea unor anomalii morfologice fetale.

În prezent, în numeroase țări, ecografia se efectuează de rutină la toate femeile gravide pentru evaluarea morfologiei și creșterii fetusului. Metodei ecografice i se descriu două niveluri.

- *Primul nivel* servește ca procedură de rutină pentru stabilirea viabilității și creșterii fetale, precum și pentru *screening*-ul anomaliilor fetale (se pot evidenția unele malformații și anumite „semne ecografice de alarmă"). *Limitele acestui nivel de evaluare* sunt determinate de rezoluția aparaturii și experiența examinatorului.
- *Ecografia fetală detaliată (nivelul II)* este o expertiză de finețe efectuată de specialiști în medicina

19. Tehnicile de imagerie fetală aparțin tehnicilor non-invazive deoarece realizarea lor nu necesită penetrarea sacului ovular (cu excepția fetoscopiei).
20. Fetoscopia are o poziție mixtă, atât ca tehnică de diagnostic ce permite analiza morfologică a structurilor fetale, cât și ca metodă de obținere a materialului biologic fetal prin biopsie (piele, mușchi).
21. Tehnicile folosite pentru obținerea de material biologic fetal sunt: biopsia de vilozități coriale (trimetrul I); amniocenteza (trimestrele II și III), cordocenteza (trimestrele II și III) și biopsia fetală prin fetoscopie (trimestrul III).
22. Tehnicile biologice sunt catalogate ca tehnici invazive deoarece sunt asociate cu metode invazive de obținere a celulelor fetale necesare analizei. În limbajul curent se face adesea confuzie între tehnica de analiză (care nu este invazivă în sine) și metoda de obținere a materialului biologic fetal (care este invazivă însă nu este o tehnică de analiză).

BCU IASI COLECTIA UNIVERSITY LIBRARY

fetală şi practicată cu aparatură performantă (cu focusare pe un anumit organ[23], ecocardiografie 3D cu imagini tridimensionale sau ecocardiografie 4D Doppler[24]). Evaluarea cu acurateţe a anatomiei fetale este posibilă printr-o ecografie de înaltă rezoluţie, în special când se combină abordarea transabdominală cu cea transvaginală.

Primul trimestru de sarcină este perioada ideală de *screenig* pentru aneuploidii, în primul rând datorită măsurării grosimii *pliului cervical* numit şi *translucenţă nucală (TN)* care reprezintă o componentă importantă a testului *screening* combinat de prim trimestru. Măsurarea TN (valoarea normală este de 3,5 mm) se face în săptămânile 11-13 şi este utilă în stabilirea riscului anuploidiei fetale, a anomaliilor cardiace congenitale sau a unor sindroame genetice şi non-genetice. Asocierea măsurării TN cu markerii biochimici creşte în mod semnificativ rata de detectare a sindromului Down. Identificarea de malformaţii fetale în primul trimestru (tabelul 19.9) creşte riscul de aneuploidie fetală.

Al doilea trimestru de sarcină: Evaluarea de rutină a anatomiei fetale între 15 şi 20 de săptămâni de sarcină este o componentă importantă a îngrijirii antenatale. „Ecografia genetică" este un termen sugestiv pentru a desemna evaluarea riscului de aneuploidii în trimestrul II de sarcină. Abilitatea *screening*-ului ecografic de a detecta anomaliile genetice presupune identificarea unor malformaţii majore asociate aneuploidiilor sau a unor aşa-zis markeri „uşori" care sunt sugestivi, însă mai puţin specifici. Markerii „uşori" nu au valoare de diagnostic, dar observarea de markeri multipli semnifică un risc crescut pentru aneupolidii. Pentru anomaliile structurale şi markerii „uşori" se foloseşte termenul general de *markeri ecografici ai aneuploidiilor fetale* (tabelul 19.10). Se constată că în trisomiile 21, 18 şi 13 există suprapuneri notabile între caracteristicile ecografice ale acestor boli. Recunoaşterea unuia sau mai multor malformaţii majore şi/sau a unei combinaţii de markeri „uşori" impune efectuarea testelor de diagnostic prenatal cromozomial, riscul de trisomie 21 fiind direct proporţional cu numărul de markeri detectaţi. Între 15% şi 30% dintre fetuşii la care se decelează ecografic anomalii morfologice prezintă anomalii cromozomiale.

Vom încheia prezentarea ecografiei subliniind din nou necesitatea diferenţierii obiectivelor celor două niveluri de analiză, între care există o mare diferenţă, necesitatea utilizării unor *protocoale standardizate*, precum şi faptul că ecografia se constituie într-un auxiliar *necesar* al procedurilor invazive de recoltare a celulelor fetale (spre exemplu, în amniocenteză – poziţia fetusului şi a placentei vor determina poziţia optimă de inserţie a acului seringii de prelevare a lichidului amniotic).

Tabelul 19.9. Malformaţii şi markeri ecografici în trimestrul I de sarcină sugestivi pentru aneuploidiile fetale

Malformaţii fetale vizibile ecografic în trimestrul I	Markeri ecografici semnificativi
Două vase în cordonul ombilical (Doppler color) – trisomie 18 *Omfalocelul* (dacă conţine doar intestin) – trisomia 18 *Holoprosencefalia* – trisomia 13 (30%) *Anencefalia* (defecte ale osificării boltei craniene) *Meningocel/encefalocel* *Hidranencefalie* *Spina bifida deschisă* (craniu în formă de lămâie şi cerebel tip banană în secţiune transversă) *Hidrocefalia* (lărgirea ventriculilor) *Malformaţia Dandy-Walker* (vermisul cerebelar absent) *Gastroschizis* (defect al peretelui abdominal) *Agenezia renală bilaterală* *Oligohidramnios* *Rinichiul polichistic* varianta infantilă sau *Hidronefroza*	*Retard de creşterea fetală* – trisomiile autozomale 18, 13, triploidia, monosomia X *Translucenţa nucală* – trisomiile autozomale 21 (90%),18, 13 monosomia X, triploidia, *Higroma chistică* – monosomia X *Osul nazal absent sau hipoplazic* – trisomia 21 (70%), trisomia 18 (55%), trisomia 13 (34%). *Unghiul fronto-maxilo-facial mărit* – trisomia 21 *Valva tricuspidă (Doppler)* *Ductul venos (Doppler)* *Rata bătăilor fetale* – tahicardie: trisomia 13, monosomia X – bradicardie: trisomia 18, triploidie *Placenta mare* – Triploidii

23. De exemplu, măsurarea dimensiunilor ventriculilor cerebrali fetali.
24. Analiza Doppler apreciază amploarea fluxului sangvin în vasele ombilicale şi poate defini patologia cardiacă fetală; fluxul redus cu rezistenţă crescută este frecvent notat în întârzierile creşterii fetale.

Tabel 19.10. Malformaţii şi markeri ecografici în al doilea trimestru de sarcină, sugestivi pentru aneuploidiile fetale

	Anomalii structurale observabile ecografic în trimestrul II de sarcină	Markeri „uşori" sugestivi, dar mai puţin specifici	Retard de creştere intrauterină
Trisomia 21	*Anomalii cardiace* *Atrezie duodenală* *Brahicefalie* *Hidrocefalie* *Clinodactilie* *Higroma chistică şi hidrops*	*Creşterea translucenţei nucale* *Ventriculomegalie* *Femur sau humerus scurt* *Nas hipoplazic* *Intestin hiperecogen* *Pielectazie* *Haluce cu semnul sandalei*	prezent
Trisomia 18	*Anomalii cardiace (90%)* *Atrezie esofagiană* *Dolicocefalie* *Hernie diafragmatică* *Omfalocel* *Meningomielocel* *Agenezie de corp calos* *Despicătură labio-palatină* *Picior strâmb congenital (în piolet)* *Aplazie de radius* *Degete suprapuse* *Chist de cordon ombilical*	*Chisturi de plexuri coroide (30%)* *Lărgirea cisternei magna* *Ventriculomegalie* *Femur sau humerus scurt* *Nas hipoplazic* *Intestin hiperecogen* *Pielectazie* *Arteră ombilicală unică*	prezent
Trisomia 13	*Anomalii cardiace* *Hernie diafragmatică* *Omfalocel* *Holoprozencefalie* *Despicătură labio-palatină* *Ciclopie* *Agenezie de corp calos* *Picior strâmb congenital* *Polidactilie* *Higroma chistică şi hidrops*	*Foci ecogenici intracardiac* *Lărgirea cisternei magna* *Ventriculomegalie* *Pielectazie* *Arteră ombilicală unică*	prezent
Triploidie	*Asimetrie* *Oligohidramnios* *Placentă mică/mare* *Ventriculomegalie* *Malformaţie Dandy–Walker* *Agenezie de corp calos* *CHD, micrognaţie* *Malformaţii renale* *Defecte de tub neural* *Picior strâmb congenital* *Sindactilie a degetelor 3 şi 4*	*Intestin hiperecogen* *Translucenţă nucală crescută*	prezent precoce

2.2. RMN

Tehnicile de imagerie fetală folosind rezonanţa magnetică nucleară (RMN) au devenit în ultimii ani metode de explorare *larg utilizate* pentru a caracteriza anomaliile evidenţiate prin ecografia fetală. Ele sunt practicate în trimestrele doi şi trei de sarcină, principala indicaţie fiind explorarea detaliată a sistemului nervos central fetal. Anomaliile intratoracice (ca hernia diafragmatică sau malformaţiile pulmonare chistice), anomaliile abdomino-pelvine (atreziile digestive, anomaliile ano-rectale) sau anomaliile placentare beneficiază, de asemenea, de aportul acestei metode de diagnostic.

2.3. Radiografia fetală

Radiografia fetală este o tehnică rar folosită, practicată în trimestrul doi sau trei de sarcină pentru a evidenţia anomalii ale scheletului fetal şi a orienta explorările biochimice sau moleculare ulterioare.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.4. Fetoscopia

Fetoscopia este o procedură endoscopică folosită pentru vizualizarea fătului, obținerea de eșantioane biologice sau pentru realizarea unor acte de chirurgie fetală endoscopică. Fetoscopia se practică după 20 săptămâni de sarcină în centre specializate și constă în inserarea, pe cale transabdominală sau transvaginală, a fetoscopului în cavitatea amniotică. Ea permite intervenții medicale ca biopsia (piele, mușchi, țesut hepatic) necesară în diagnosticul unor boli precum genodermatozele, distrofiile musculare sau bolile hepatice și realizarea unor acte de chirurgie fetală endoscopică (ablația, cu ajutorul laserului, a vaselor de sânge placentare în cazul sarcinilor gemelare cu sindrom transfuzor-transfuzat, obstrucția traheei în hernia diafragmatică congenitală sau realizarea unui șunt vezico-amniotic în obstrucțiile tractului urinar inferior).

Complicațiile potențiale constau în infecții ale fătului sau mamei, ruptura prematură de membrane și nașterea prematură, moartea fetală (3-5%). Procedura se aplică numai celor mai grave cazuri, după o atentă evaluare a riscurilor și beneficiilor.

2.5. Metode de obținere a materialului biologic fetal

2.5.1. Biopsia vilozităților coriale

Biopsia vilozităților coriale (BVC)[25] este metoda de obținere a unor fragmente de vilozități coriale (figura 19.3), structuri de origine embrionară ce derivă din trofoblast, partea externă a blastocistului (vezi și figura 15.1). Materialul biologic obținut conține atât celule cu origine embrionară, cât și celule din decidua maternă, care trebuie îndepărtate cu grijă înaintea analizelor ulterioare. Celulele trofoblastice pot fi utilizate pentru purificarea ADN fetal în scopul efectuării diagnosticului molecular direct (detectarea mutațiilor) sau indirect, precum și pentru realizarea analizei cromozomiale, fie directe (posibilă datorită activității mitotice înalte a acestor celule), fie după o etapă de cultură.

BVC se efectuează la 10-12 săptămâni de gestație[26], pe cale transcervicală (cu ajutorul unui cateter flexibil), sau transabdominal (cu un ac subțire de puncție rahidiană), sub ghidaj ecografic, în funcție de localizarea placentei. Se recoltează aproximativ 10-15 mg de țesut care se aspiră într-o seringă. Cantitatea de celule

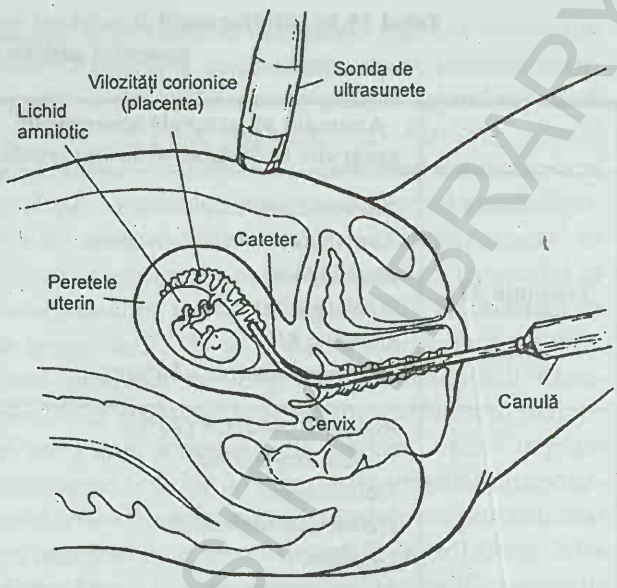


Figura 19.3. Biopsia vilozităților coriale

prelevate este mai mare decât în cazul amniocentezei, de aceea este metoda preferată pentru purificarea ADN fetal în vederea realizării examenelor moleculare.

Complicațiile BVC sunt reprezentate de sângerări (40%), avort (1-2% în plus față de nivelul bazal de 2-5% pentru perioada gestațională de 7-12 săptămâni), producerea unor malformații ale membrelor (anomalii transverse) și feței, mai ales când este practicată înaintea săptămânii a 10-a de sarcină[27].

2.5.2. Amniocenteza

Amniocenteza este procedura prin care se obține un eșantion de lichid amniotic (LA) prin puncție transabdominală, ghidată ecografic (figura 19.4). LA conține celule de origine fetală[28] care pot fi folosite fie imediat, pentru diagnosticul rapid al aneuploidiilor fetale prin tehnici de citogenetică moleculară interfazică (FISH cu sonde specifice cromozomilor 13, 18 și 21), fie pentru purificarea ADN fetal, fie după o etapă de cultură[29] în vederea efectuării analizelor citogenetice (rezultatele analizei obținându-se, însă, după 2-4 săptămâni, ceea ce constituie un dezavantaj semnificativ) sau a purificării ADN fetal utilizat în diagnosticul molecular. De asemenea, în LA pot fi realizate dozări biochimice, în special AFP și acetilcolinesteraza care, împreună cu ecografia fetală, pot diagnostica 99% din cazurile de DTN deschise sau defecte ale peretelui abdominal anterior.

25. În limba engleză CVS – de la *chorionic villus sampling*.
26. Poate fi efectuată și într-un stadiu mai tardiv de sarcină, dar în acest caz se numește biopsie placentară.
27. Mecanismele teratogenice posibile ar fi producerea unor embolii în circulația fetală sau hipoperfuzia (determinată de hemoragie feto-maternă sau spasme vasculare consecutive eliberării unor substanțe presoare).
28. Celulele fetale provin din descuamațiile pielii sau mucoaselor tractului urinar sau digestiv.
29. Eșecurile cultivării celulelor amniotice variază între 0,8-1%, în condițiile unei tehnici perfecte.

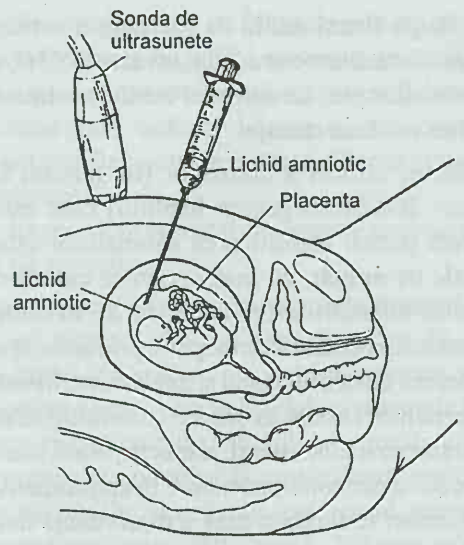


Figura 19.4. Amniocenteza

Amniocenteza „clasică" se practică (de obicei în ambulatoriu) la 15-17 săptămâni de gestație (după prima zi a UM); în unele centre se folosește și amniocenteza „precoce", la 12-14 săptămâni de sarcină.

În toate situațiile amniocenteza este precedată de o examinare ecografică atentă pentru a stabili: numărul de fetuși, conformația și viabilitatea fetală, vârsta gestațională, poziția placentei, volumul aproximativ al LA și locul puncției (în funcție de poziția placentei și a fătului). Apoi, sub ghidaj ecografic, se introduce transabdominal până în cavitatea amniotică, un ac de puncție amniotică cu diametrul 0,5-0,9 mm (20-25 Gauge) de lungime variabilă (între 9-15 cm). Ecografia continuă în timpul amniocentezei permite medicului să aibă o imagine permanentă a vârfului acului și a poziției fătului. Primii 1-2 ml de LA (ce pot fi contaminați cu celule materne) se extrag cu o seringă de 2 ml și apoi cu o altă seringă se aspiră 15-20 ml LA (aproximativ 1ml/săptămâna de sarcină); în cazul amniocentezei precoce[30] se extrag doar câțiva ml. Proporția actelor reușitelor este de peste 99%. În 1-2% de cazuri se poate produce o ușoară contaminare cu sânge matern, în cazul puncțiilor transplacentare. După amniocenteză se supraveghează ecografic bătăile cordului fetal și se urmărește starea gravidei (scurgeri vaginale de LA sau sânge, contracții). În unele situații (uter fibromatos, oligoamnios, retroversie uterină, obezitate maternă) amniocenteza poate fi o procedură dificilă.

Complicația majoră a amniocentezei este riscul de 0,5% de inducere a avortului, risc crescut la 2-3% în cazul puncției transplacentare datorită unei localizări anterioare a placentei. Acest risc se adaugă riscului bazal de avort spontan de 2-3% corespunzător *oricărei sarcini* în trimestrul II. Amniocenteza „precoce" are o rată de avort de 3 ori mai mare decât cea „clasică".

Alte complicații rare sunt: hemoragia intraamniotică, scurgerile mici de LA pe cale vaginală, sângerări pe cale vaginală sau la locul de puncție sau infecțiile intraamniotice (extrem de rare).

2.5.3. Cordocenteza

Cordocenteza[31] este procedura prin care se obține sânge fetal puncționând, sub ghidaj ecografic, rădăcina cordonului ombilical (proporția reușitelor fiind sub 95%) (figura 19.5). Tehnica este similară amniocentezei, dar unghiul de dirijare este mult mai precis pentru a penetra vena ombilicală a fătului. Se aspiră 2-3 ml de sânge fetal, o cantitate care nu determină fătului nici o problemă hemodinamică. În laborator sângele prelevat trebuie verificat pentru a se dovedi originea fetală.

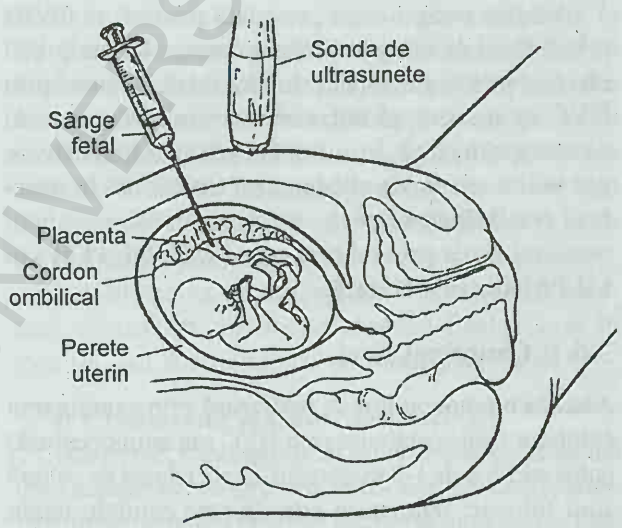


Figura 19.5. Cordocenteza

Cordocenteza se practică de obicei după 20 săptămâni de sarcină, la paciente la care s-a înregistrat un eșec al culturilor de celule amniotice sau s-a identificat un mozaicism feto-placentar, ori atunci când diagnosticul ADN nu este posibil pentru o boală ce poate fi identificată prin teste biochimice ale plasmei ori ale celulelor sangvine (unele afecțiuni hematologice sau imunologice ereditare, infecții bacteriene, virale sau parazitare congenitale). Sângele fetal necesită numai câteva zile de cultură pentru obținerea unor preparate cromozomiale de foarte bună calitate.

Complicațiile sunt mai frecvente față de celelalte proceduri invazive. Riscul de avort asociat acestei proceduri este 2-3%. Complicațiile adiționale sunt similare amniocentezei și includ sângerări la locul de puncție, infecții, sau ruptura precoce de membrane.

30. În acest caz procesarea LA presupune o tehnicitate remarcabilă.
31. În limba engleză PUBS – de la *percutaneous umbilical blood sampling*.

BCU "VICTOR BABEȘ" UNIVERSITY LIBRARY

2.6. Tehnici de analiză citogenetică

Diagnosticul anomaliilor cromozomiale la făt reprezintă cea mai frecventă componentă a DPN, fiind indicat în cazul antecedentelor familiale de anomalii cromozomiale (prezența unei anomalii cromozomiale structurale la unul dintre părinți sau dacă în familie există un copil cu o anomalie cromozomială *de novo*) precum și la gravidele la care există un risc crescut de aneuploidie fetală (vârsta peste 35 de ani, cu triplu test pozitiv sau cu semne ecografice de alarmă). Diagnosticul citogenetic prenatal nu este recomandat în următoarele situații: boli monogenice, istoric familial de defecte de tub neural, iradieri terapeutice materne sau paterne anterioare concepției, anxietate parentală, informarea cu privire la sexul fătului (dacă nu există istoric de boli recesive legate de cromozomul X).

Analiza citogenetică prenatală poate fi realizată prin tehnici de citogenetică convențională (cariotipul efectuat prin examinarea celulelor fetale obținute prin BVC, amniocenteză sau, mai rar, prin cordocenteză) ce necesită o etapă de cultură celulară. Alternativ, se pot utiliza tehnici de citogenetică moleculară în interfază (realizându-se ceea ce este numit *diagnosticul prenatal rapid* prin tehnicile de FISH, QF-PCR sau MLPA) sau în metafază.

2.6.1. Cariotipul fetal

Analiza cromozomilor se realizează prin examinarea celulelor fetale (obținute prin BVC sau amniocenteză) cultivate timp de 1-2 săptămâni. Două tehnici de cultură sunt folosite: tehnica *in situ*, în care celulele fetale de tip aderent vor prolifera formând colonii, grupuri de celule ce au o origine comună provenind dintr-o singură celulă, și tehnica cu tripsinizare, în care celulele sunt decolate și reînsămânțate în mai multe flacoane. Mult mai rar, cromozomii pot fi analizați pe preparate obținute prin culturi (3 zile) de sânge fetal recoltat prin cordocenteză, în acest caz celulele proliferând în suspensie.

a) Cariotipul fetal după BVC

Cariotipul fetal după BVC poate fi obținut prin două metode:

- analiză directă a celulelor citotrofoblastului care se divid spontan folosind sau nu o tehnică de denaturare și marcaj în benzi. Avantajele acestei metode sunt obținerea unui rezultat rapid, în 2-3 zile, și probabilitatea redusă de contaminare cu celule materne.
- cultura de celule și realizarea unei tehnici de marcaj în benzi ce necesită aproximativ 14 zile. În acest caz sunt analizate celulele de tip fibroblastic sau mezenchimatos cu origine în porțiunea centrală a vilozității coriale.

Pe lângă riscul dublu de pierdere a sarcinii față de amniocenteză asociat actului invaziv (1,5%), analiza cromozomilor prin cariotiparea celulelor obținute prin BVC are ca dezavantaje:

- calitatea redusă a mitozelor (în general aproximativ 300 benzi/genom haploid) care este suficientă pentru identificarea anomaliilor cromozomiale de număr, nu însă și pentru caracterizarea multor anomalii cromozomiale de structură;
- necesitatea realizării cariotipului prin ambele tehnici, deoarece citotrofoblastul și axa mezenchimatoasă a vilozităților coriale au origine embriologică diferită: țesutul extraembrionar și, respectiv, masa internă din care se va dezvolta embrionul. În aproximativ 1-2% din cazuri se înregistrează o discordanță între cele două cariotipuri, determinată de o posibilă contaminare cu celule materne, de o anomalie cromozomială apărută în timpul culturii sau de existența unui mozaicism placentar și/sau fetal. În acest caz sunt necesare metode adiționale de analiză (amniocenteza, cordocenteza) pentru a determina cariotipul fetal real;
- imposibilitatea dozării AFP în LA, acuratețea dozării AFP din sângele matern între 15-20 săptămâni fiind mai mică.

Principalul avantajul al diagnosticului citogenetic în primul trimestru de sarcină este obținerea unui rezultat precoce, ce scade perioada de incertitudine și stresul psihologic al părinților și permite întreruperea sarcinii la sfârșitul trimestrului I, prin metode mai facile.

b) Cariotipul fetal după amniocenteză

Analiza cariotipului fetal folosind celulele obținute prin puncție amniotică necesită o etapă de cultură celulară de 10-14 zile. Celulele sunt de tip aderent, iar tehnica de analiză cel mai frecvent utilizată este cea *in situ*. Probabilitatea contaminării cu celule materne este cu mult mai mică decât în cazul BVC.

c) Cariotipul fetal după cordocenteză

Analiza cariotipului limfocitelor fetale necesită o cultură de scurtă durată (3 zile) astfel încât această tehnică este folosită în special atunci când rezultatul trebuie obținut rapid sau când rezultatele cariotipului prin BVC sau amniocenteză necesită confirmare.

d) Mozaicismul cromozomial

Mozaicismul cromozomial este o situație rar întâlnită în citogenetica prenatală, fiind observată, în medie, la 5% dintre fetușii analizați în al doilea trimestru de sarcină, comparativ cu numai 1 din 3.500 nou-născuți vii. Termenul de mozaic definește prezența, într-un organism sau țesut, a două sau mai multe linii celulare genetic distincte, derivate dintr-un singur zigot.

Tehnicile citogenetice ce folosesc cultura de celule aderente (obținute după BV sau amniocenteză) necesită examinarea mai multor mitoze provenind din celule aparținând unor colonii diferite (pentru tehnica *in situ*) sau din flacoane de cultură diferite (tehnica cu tripsinizare).

În diagnosticul prenatal citogenetic se descriu patru tipuri de mozaicuri:

- *mozaicismul adevărat* corespunde situației în care tipuri celulare diferite sunt detectate în colonii multiple din mai multe culturi primare diferite (două sau mai multe linii celulare detectate în două flacoane de cultură). Studiile postnatale confirmă prezența mozaicului la nou-născut, majoritatea mozaicurilor adevărate implicând gonozomii, cromozomii mici (18, 20, 21, 22) sau un cromozom marker;
- *mozaicismul monocelular*, sau mozaicismul de nivelul I, corespunde identificării unei celule cu un extracromozom sau cu o anomalie structurală într-o singură colonie sau într-un singur flacon de cultură. Acest tip de mozaicism are o incidență de circa 3% și poate fi considerat o eroare de diviziune mitotică în timpul culturii;
- *pseudomozaicismul*, sau mozaicismul de nivelul II, corespunde identificării a două sau mai multe celule cu aceeași anomalie într-o singură colonie sau flacon de cultură. Pseudomozaicismul reprezintă 0,5% din toate mozaicurile, interesează cel mai frecvent cromozomii 2, 3, 7, 18 și poate fi considerat o eroare de diviziune mitotică în timpul culturii.
- *mozaicismul limitat la placentă* („*confined placental mosaicism*") are o incidență de 1-2% din sarcinile viabile. O placentă cu cariotip anormal poate determina întârzierea creșterii fetale, naștere prematură și chiar moartea fătului, deși cariotipul fetal este normal; invers, o placentă cu cariotip normal poate permite supraviețuirea mai îndelungată a unui fetus cu anomalii cromozomiale[32]. De menționat că prezența unei trisomii placentare se asociază frecvent cu un risc înalt de disomie uniparentală în celulele fetale, disomia corespunzând perechii cromozomiale trisomice din placentă.

Cele mai multe mozaicuri detectate în celulele trofoblastului sunt cauzate de generarea unui extracromozom în cursul cultivării *in vitro* (pseudomozaicism) sau de contaminarea cu celule materne (mozaicism cu linii XX și XY) datorită asocierii intime între celulele materne și celulele vilozităților coriale. Diferențierea de mozaicismul adevărat este posibilă prin recurgerea la tehnici capabile să stabilească dacă toate celulele dintr-o colonie sunt descendente ale unei singure celule fetale.

Confirmarea și interpretarea mozaicismului reprezintă una dintre cele mai dificile probleme legate de DPN. *Confirmarea* mozaicismului se poate face numai prin analiza celulelor sângelui fetal obținut prin cordocenteză, deși o ecografie normală (fără tulburări de creștere și anomalii congenitale) este de bun augur.

e) Semnificația clinică a mozaicismului

Mozaicismele de nivel I și II apar ca urmare a unor erori de distribuție a cromozomilor în timpul culturii celulare și nu se asociază cu anomalii fetale. În cazul mozaicismelor adevărate efectele clinice sunt variabile, în funcție de cromozomul implicat, de distribuția tisulară și de proporția celulelor anormale. Astfel, peste 50% din mozaicurile identificate prin BVC ce interesează gonozomii nu sunt regăsite la făt. Este recunoscută relația dintre mozaicismul limitat la placentă și retardul creșterii intrauterine sau rata crescută a avorturilor. În schimb, prezența unei linii cu trisomie autozomală în care sunt implicați cromozomii 8, 9, 13, 15, 18, 21, 22 sau, foarte rar, iso(12p) (sindromul Pallister-Killian) reclamă efectuarea unor investigații extensive deoarece, în aceste cazuri, probabilitatea ca un mozaicism fetal să fie prezent este importantă, iar aceste trisomii fetale, chiar în mozaic, pot fi asociate cu un fenotip anormal.

f) Cromozomi markeri sau derivați

Ocazional, cariotipul fetal poate evidenția prezența unui număr normal de cromozomi asociată cu o rearanjare cromozomială rară sau prezența unui cromozom marker supranumerar (cromozomi a căror origine nu poate fi stabilită prin marcajul în benzi). Cel mai frecvent cromozomii marker sunt mici cromozomi bisatelizați derivați din cromozomii 22 și 15. Semnificația prezenței acestui cromozom la fetus nu poate fi stabilită fără analiza cromozomilor la ambii părinți și fără identificarea originii și conținutului său în eucromatină prin tehnici de citogenetică moleculară. Dacă markerul este identificat la un părinte cu fenotip normal și cromozomul conține doar heterocromatină atunci el pot fi considerat ca o variantă normală. Rearanjările *de novo* aparent echilibrate (translocații reciproce, inversii) sunt, cel mai adesea fără efect fenotipic, deși un fenotip anormal poate apare dacă o genă importantă în dezvoltare este situată la punctele de rupere a cromozomilor. Rearanjările *de novo* neechilibrate, în funcție de mărimea fragmentelor cromozomiale implicate, pot cauza anomalii fetale sau pot determina doar anomalii evidente postnatal (dismorfie, retard mental).

32. Cariotipul normal în placentă se poate produce prin pierderea cromozomului suplimentar prezent la făt.

2.6.2. Tehnici de citogenetică moleculară

Gama de tehnici de citogenetică moleculară ce pot fi utilizate în cadrul diagnosticului prenatal citogenetic este largă căci, practic, toate tehnicile pot fi folosite. Folosirea acestor tehnici, dependentă de indicații, poate fi divizată în următoarele categorii:

a) Diagnosticul rapid interfazic al aneuploidiilor

Tehnici de citogenetică moleculară precum FISH, QF-PCR sau MLPA pot fi folosite pentru diagnosticarea aneuploidiilor fetale fără ca o etapă de cultură celulară să fie necesară. Aceste tehnici folosesc fie direct celulele obținute în urma unui act invaziv (BVC, puncție de lichid amniotic), ca în cazul tehnicii FISH, fie necesită purificarea ADN fetal (tehnicile QF-PCR și MLPA). Avantajul acestor tehnici țintite este rapiditatea obținerii rezultatului (24-48 de ore) însă analiza este limitată numai la diagnosticul aneuploidiilor cromozomilor 13, 18, 21 și X, anomaliile de număr interesând alți cromozomi sau anomaliile de structură neputând fi diagnosticate cu aceste tehnici.

b) Tehnici țintite metafazice

Tehnica de FISH cu sonde adaptate poate fi folosită fie atunci când există un risc de microdeleție/microduplicație a unei regiuni cromozomiale datorită antecedentelor familiale sau a descoperirii unor semne ecografice de alarmă sugestive pentru sindroame cu microdeleție/microduplicație, fie când există, la unul din părinți, o anomalie cromozomială echilibrată, în special când fragmentele cromozomiale implicate sunt de talie mică și evidențierea cromozomilor derivați este dificilă. În aceste situații sunt realizate, pe lângă cariotipul fetal, hibridizări cu sonde specifice fie regiunilor implicate în sindroamele cu microrearanjări cromozomiale, fie regiunilor implicate în anomalia parentală.

c) Caracterizarea unei anomalii cromozomiale fetale identificate prin citogenetică convențională

Identificarea unui cromozom marker sau în inel supranumerar, *de novo* sau moștenit, sau a unei anomalii cromozomiale *de novo* aparent echilibrate la făt, asociată sau nu cu semne ecografice de alarmă, necesită caracterizarea anomaliei din punct de vedere molecular pentru a identifica atât originea și conținutul genic al cromozomilor marker sau în inel (cu tehnicile FISH, M-FISH, CGH și microrețele de ADN), cât și prezența unor microdeleții sau microduplicații la punctele de rupere a cromozomilor în cazul anomaliilor aparent echilibrate (microrețele de ADN).

d) Sindroame polimalformativ cu cariotip normal

Identificarea unui sindrom polimalformativ fetal ce nu este sugestiv unui sindrom cromozomial bine definit (în acest caz o explorare țintită neputând fi realizată) necesită o explorare la scara întregului genom în scopul identificării unei eventuale anomalii cromozomiale dezechilibrate. Rezoluția cariotipului fiind de numai 5-10 Mb, în cazul în care cariotipul este normal, este recomandată analiza cu ajutorul microrețelelor de ADN.

Avantajele acestei metode constau în înalta rezoluție a analizei (50 Kb – 1 Mb, în funcție de tipul de microrețele utilizate), rapiditatea obținerii rezultatelor (dependentă însă de cantitatea și calitatea ADN obținut din eșantionul inițial, uneori fiind necesară o cultură celulară), sensibilitatea și posibilitatea automatizării. Dezavantajul acestei tehnici constă în evidențierea tuturor variațiilor numărului de copii, patogenice sau nu, și necesită adesea analize complementare la părinți. În unele situații caracterul patogen este evident datorită conținutului genic, în alte situații, după efectuarea analizelor parentale, caracterul patogen este foarte probabil însă există și situații în care este imposibil de tranșat între caracterul patogen sau nonpatogen al variației, sfatul genetic în acest caz fiind extrem de dificil.

2.6.3. Strategia analizei citogenetice prenatale

Strategiile de analiză citogenetică prenatală sunt stabilite în principal în funcție de motivele care determină realizarea testului diagnostic:

- **Indicații stabilite preconcepțional.** În cazul prezenței, la unul din părinți, a unei anomalii cromozomiale echilibrate se poate recurge la BVC (analiză directă și prin cultură) sau la amniocenteză. Cariotipul obținut prin analiza celulelor trofoblastice are avantajul de a oferi un rezultat precoce în cursul sarcinii și poate fi asociat cu tehnici de citogenetică moleculară (FISH, sonde de pictură cromozomială, CGH) care, folosind sonde judicios alese în regiunile cromozomiale rearanjate la părintele purtător al anomaliei cromozomiale, permit identificarea dezechilibrelor meiotice, chiar dacă acestea afectează fragmente de talie mică sau rezoluția analizei cromozomilor este redusă. În cazul evidențierii, prin analiza celulelor trofoblastice, a unui mozaicism sau a unei discordanțe feto-placentare este recomandată realizarea unui nou cariotip (amniocenteza sau cordocenteză).
- **Rezultat anormal la testele de depistare.** În cazul unui test de depistare anormal efectuat în primul trimestru analiza citogenetică poate fi realizată în primul sau al doilea trimestru de sarcină (celulele fetale fiind obținute prin BVC sau, respectiv, prin amniocenteză). Diagnosticul citogenetic rapid prin tehnici moleculare poate fi realizat, un rezultat normal în acest caz fiind considerat, în unele țări,

ca suficient pentru a considera că fătul este normal dacă nu sunt asociate semne ecografice de alarmă. Prezența acestora impune însă analiza cromozomilor prin tehnici de citogenetică convențională, indiferent dacă a fost realizat sau nu un diagnostic rapid molecular (analiza cu ajutorul microrețelelor de ADN nefiind recomandată în acest caz).

- **Sindroame polimalformative fetale, întârzierea creșterii intrauterine.** Analiza cromozomială este realizată, cel mai frecvent, în trimestrul al doilea. Analiza cariotipului este completată cu analize țintite prin tehnici de citogenetică moleculară (FISH) sau cu analiza la scara întregului genom folosind microrețele de ADN.

2.7. Tehnici de analiză moleculară

Numeroase afecțiuni monogenice (vezi tabelul 19.6) pot fi diagnosticate prin analiza ADN, folosind metode de detectare directă a mutațiilor sau diagnosticul indirect, prin studiul unor markeri strâns înlănțuiți cu gena mutantă. Tehnicile folosite cel mai frecvent sunt cele ce realizează diagnosticul direct, țintit, al mutațiilor (mutațiile parentale fiind deja cunoscute) sau secvențierea genei. Diagnosticul indirect poate fi realizat în unele situații însă necesită ca analiza familiei să fie efectuată înaintea sarcinii (colectarea eșantioanelor de la toți membrii familiei și analiza lor necesitând un interval de timp important, adesea mai lung decât îl poate permite o sarcină în curs). Exceptând bolile genetice comune – fibroza chistică, sindromul X fragil – analiza prenatală a ADN se efectuează de obicei în laboratoare specializate, fiind preferabilă cunoașterea mutației patogenice caracteristică unei familii, ceea ce reduce atât durata investigației, cât și costurile.

2.8. Determinări biochimice pentru boli metabolice

Peste 100 de boli metabolice pot fi diagnosticate prenatal prin studii biochimice efectuate pe celule fetale sau în lichidul amniotic. Cele mai multe dintre aceste boli sunt autozomal recesive, având, ca atare, un risc de recurență înalt (25%), fapt care justifică DPN. Deoarece unele dintre bolile metabolice sunt foarte rare, adresabilitatea este, implicit, redusă, motiv pentru care centrele obișnuite nu își permit, din punct de vedere economic, să-și asigure logistica necesară investigării lor. Gravidele cu risc vor trebui, așadar, să se adreseze centrelor specializate, sau să li se ofere alternativa investigării ADN.

3. Tehnici speciale de diagnostic prenatal

3.1. Diagnosticul genetic preimplantatoriu

Diagnosticul genetic preimplantatoriu (DGP), introdus în 1990, este definit ca fiind ansamblul de tehnici folosite pentru testarea embrionilor și ovulelor înainte de implantare, în vederea descoperirii defectelor genetice, ca o alternativă la diagnosticul prenatal. Aceste tehnici sunt folosite pentru diagnosticul bolilor grave cu transmitere mendeliană, a anomaliilor structurale ale cromozomilor sau bolilor mitocondriale. Un program DGP necesită o strânsă colaborare între o unitate de genetică clinică, o unitate de fertilizare *in vitro* (FIV) și un laborator de diagnostic molecular sau citogenetic.

Embrionii sunt produși prin fertilizare *in vitro* (FIV), diagnosticul genetic preimplantatoriu putând fi realizat fie prin analiza celulelor obținute prin biopsia embrionului (blastomere recoltate în stadiul de 6-8 celule sau celule ale trofectodermului recoltate de la embrioni în ziua 5-6 de dezvoltare, conținând aproximativ 120 de celule) (diagnostic direct căci examinează celule embrionare), fie prin analiza primului sau celui de-al doilea globul polar (diagnostic indirect). Numai embrionii neafectați sunt transferați în uterul femeii, pregătită pentru sarcină.

DGP este complex și solicită multă experiență. Procedurile de diagnostic, ce au fost puse la punct anterior, uneori fiind specifice cuplului consultant, trebuie să fie precise și rapide pentru a permite transferul embrionului nu mai târziu de ziua 6. În funcție de indicația diagnostică se folosesc curent două metode: amplificarea genică prin PCR – pentru diagnosticul mutațiilor genice – și analiza cromozomială prin FISH interfazic. Acuratețea diagnosticului nu este de 100% căci biopsia și analiza unei singure celule scade semnificativ eficiența diagnosticului bazat pe PCR, în timp ce eficiența procedurii FISH rămâne similară, fie că e vorba de una sau două celule extrase. Dacă nu există suficient timp pentru analize, embrionii pot fi congelați și transferați mai târziu, în acest caz reducându-se însă semnificativ șansele de succes ale unei noi sarcini.

Trecând peste dificultățile de a obține embrioni prin FIV, problema cea mai mare cu care se confruntă DGP este faptul că numai *una sau două celule sunt disponibile* pentru analiză; în aceste condiții și *în timpul scurt* de care se dispune pentru studiu se pot produce erori de diagnostic. Una dintre sursele acestor erori este *mozaicismul cromozomial*, frecvent la embrionii în stadiul preimplantatoriu; în aceste condiții nucleul unui blastomer nu poate fi reprezentativ pentru restul embrionului.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

DGP este realizat la cuplurile care nu acceptă diagnosticul prenatal din motive etice sau religioase, sau la cuplurile care au avut deja mai multe întreruperi de sarcină ca urmare a identificării prin diagnostic prenatal a mai multor fetuşi afectaţi. Indicaţiile actuale ale diagnosticului genetic preimplantatoriu sunt următoarele:

(1) Selecţia sexului[33] *la embrionii cu mutaţii ale genelor localizate pe cromozomul X.* Sexul genetic este determinat prin FISH, folosind sonde specifice cromozomilor sexuali.

(2) Diagnosticul unor boli monogenice. În principiu, toate bolile monogenice pentru care se pot face un diagnostic direct pre sau postnatal pot fi studiate şi în stadiul pre-implantaţional. Tehnica cea mai folosită este identificarea, prin PCR, a mutaţiilor prezente la părinţi. *Screening*-ul este mai rar folosit, deoarece necesită o etapă de amplificare a genomului care poate determina variaţii în rata de succes a reacţiilor PCR ulterioare.

Lista indicaţiilor pentru bolile monogenice diagnosticate prin PCR cuprinde mai mult de 80 de entităţi diferite, cum ar fi:

- boli autozomale recesive: beta-talasemiile, fibroza chistică, atrofia musculară spinală;
- boli autozomale dominante: boala Huntington, distrofia miotonică, boala Charcot-Marie-Tooth;
- boli legate de X: sindromul X fragil, distrofia musculară Duchenne, hemofilia.

(3) Purtătorii de anomalii cromozomiale echilibrate[34] – au un risc crescut de a avea descendenţi cu monosomii sau trisomii parţiale (vezi capitolul 10).

Tehnicile folosite în aceste situaţii sunt:
a) FISH cu sonde adecvate pentru analiza segregării meiotice a anomaliei echilibrate parentale studiind un blastomer sau primul globul polar;
b) hibridizare genomică comparativă pe microreţele de ADN, după o etapă de amplificare a ADN conţinut într-un singur blastomer. Studii recente folosind această tehnică au evidenţiat prezenţa, într-o proporţie importantă, a anomaliilor de număr şi de structură în blastomere, consecinţă a instabilităţii mitotice a primelor diviziuni.

(4) Boli mitocondriale – DGP este cea mai bună opţiune de management în prezent în cazul multor boli ale ADNmt. Aplicabilitatea acestei metode de diagnostic depinde de trei parametri, ce pot fi varia de la o mutaţie la alta: corelaţia existentă între proporţia de molecule de ADN mutante şi gravitatea bolii; distribuţia uniformă a moleculelor mutante de ADNmt între blastomere; stabilitatea în timp a proporţiei de molecule mutante. Numărul mare de copii ale ADNmt fac ca analiza să fie mai puţin expusă la artefacte cum ar fi greşelile de amplificare.

(5) DGP pentru transplantul de celule suşă. Această nouă indicaţie (pentru care aspectele etice nu au fost complet rezolvate) implică selecţia unor embrioni compatibili din punct de vedere al antigenelor leucocitare umane (HLA). Dacă un copil născut anterior prezintă o boală ce necesită un transplant de celule suşă hematopietice şi nu există un donator compatibil, atunci studiul compatibilităţii HLA în stadiul preimplantaţional poate fi folosit pentru a alege un embrion compatibil ce ulterior va fi folosit ca donator. Două situaţii sunt întâlnite:

- existenţa unei anomalii genetice în familie ce justifică ea însăşi un diagnostic preimplantatoriu asociată cu prezenţa unui copil bolnav de aceeaşi boală şi care necesită un transplant de celule suşă hematopoietice (cum ar fi anemia Fanconi sau talasemia);
- prezenţa la un copil a unei malignităţi dobândite (leucemia, de exemplu) fără ca un risc genetic să fie evidenţiat în acea familie. În acest caz unicul criteriul de selecţie este compatibilitatea HLA, iar acceptabilitatea morală a actului este discutabilă, căci nu există un beneficiu direct pentru embrion al procedurii de DGP, scopul noii sarcini fiind uneori doar cel de a vindeca copilul deja născut.

(6) Alte indicaţii: femei cu vârsta de peste 35 de ani, cupluri cu avorturi repetate, suspiciunea unui mozaicism gonadal.

De precizat că atât Societatea Americană de Medicină a Reproducerii umane cât şi Societatea Britanică a Fertilităţii au hotărât să nu sprijine folosirea DGP, aşa cum este folosit în mod curent, pentru a îmbunătăţi rata sarcinilor reuşite la pacientele cu vârstă maternă avansată, eşecuri implantaţionale recurente sau eşecuri reproductive repetate.

Cu toate progresele tehnice realizate în ultimii ani, DGP are numeroase limite tehnice şi ridică probleme etice. În primul rând întrebarea fundamentală este dacă DGP-ul este acceptabil din punct de vedere moral. Transferul selectiv al embrionilor putând fi comparat cu avortul selectiv, nu este potrivit să acceptăm diagnosticul prenatal urmat posibil de avort selectiv şi în acelaşi timp să blamăm DGP. Facilităţile pe care le oferă o alegere informată bazată pe o consultare adecvată sunt bineînţeles de o importanţă crucială. Există o gamă largă de aplicaţii ale DGP pentru *modelul medical* folosit la prevenirea naşterii unui copil cu o boală sau anomalie ereditară. Fără discuţie folosirea

33. Tehnicile actuale pentru caracterizarea mutaţiilor de pe cromosomul X au o durată prea mare pentru a fi utilizate în DGP.
34. Dacă femeia este purtătoare a anomaliei este posibil un diagnostic indirect (PCGD – *preconception genetic diagnosis*) prin analiza cromozomilor primului globul polar, înainte de fertilizarea ovocitului.

DGP creşte conflictul dintre problemele practice şi cele etice (vezi capitolul 21).

Folosirea PGD-ului pentru bolile autozomale dominante cu debut tardiv, ca de exemplu coreea Huntington, este foarte controversată. Criticii spun că folosirea DGP este iresponsabilă, deoarece copilul ar putea trăi mulţi ani fără simptome, dar susţinătorii DGP consideră că aceasta nu justifică cruda realitate şi anume faptul că boala afectează oamenii în perioada de început a vieţii lor adulte, are un parcurs fatal şi afectează descendenţii.

3.2. Analiza celulelor fetale din sângele matern

Este cunoscut faptul că la femeile gravide, una din 10^8 – 10^9 celule nucleate circulante îşi are originea în organismul fetusului. Celulele fetale care circulă în sângele matern sunt de trei tipuri: limfocite, eritroblaşti şi celule ale sinciţiotrofoblasului. Din cele trei tipuri celulare prezente în sângele gravidei, eritroblaştii par a fi cei mai adecvaţi pentru depistarea prenatală. Potrivit unor date recente, numărul celulelor fetale din sângele matern este mai mare în cazul sarcinilor cu fetuşi prezentând aneuploidii şi, în special, al celor cu trisomie 21, ceea ce ar facilita detecţia unor astfel de anomalii.

Celulele fetale pot fi identificate şi izolate din sângele matern fie datorită prezenţei de antigene specifice (antigene diferite între mamă şi fetus sau antigene specifice celulelor trofoblastice), fie datorită dimensiunilor celulare diferite (celulele sinciţiotrofoblasului fiind mai voluminoase decât celulele sangvine).

Acurateţea rezultatelor este determinată de „puritatea" celulelor fetale izolate:

- purificarea poate fi realizată fie prin trierea celulelor fetale cuplate cu anticorpi specifici fluorescenţi sau cuplaţi cu bile magnetice folosind citometria în flux sau separarea magnetică, fie prin separarea mecanică a celulelor cu ajutorul unor „site" ce reţin celulele de mari dimensiuni, cel mai frecvent de origine fetală.
- analiza celulelor astfel obţinute se realizează cu tehnici de înaltă sensibilitate (PCR, FISH), nu înainte însă de a fi confirmată originea lor fetală.

3.3. Analiza ADN fetal din sângele matern

O alternativă la analiza celulelor fetale din sângele matern o reprezintă analiza fragmentelor de ADN extracelular provenite de la făt şi care se află în circulaţia gravidei. Este cunoscut că atât gravida, cât şi fătul, produc ADN extracelular. Sursa primară de ADN fetal o constituie corpii apoptotici rezultaţi din moartea celulelor sinciţiotrofoblastului, în timp ce ADN extracelular matern îşi are, majoritar, originea în celulele hematopoietice. Utilizarea pentru diagnostic a ADN fetal liber (ADNfl) din plasma maternă este limitată în prezent de doi factori: cantitatea redusă de ADN fetal comparativ cu cea a ADN matern (numai 5-10% din ADN plasmatic total este ADN fetal) şi mărimea redusă a fragmentelor (100-140 pb). Aplicaţiile clinice actuale ale studiului ADNfl se bazează pe identificarea în ADN circulant matern a unor markeri absenţi în genomul matern. Două dintre aceste aplicaţii sunt folosite în prezent de rutină în unele laboratoare de diagnostic, iar în cazul altor două a fost demonstrată posibilitatea utilizării în diagnosticul de rutină prin studii realizate în laboratoare de cercetare.

- *Diagnosticul sexului fetal* pe baza identificării în ADN circulant matern, prin tehnica PCR, a unor markeri localizaţi pe cromozomul Y. Astfel, o reacţie pozitivă semnifică un făt de sex masculin, iar o reacţie negativă un făt de sex feminin.
- *Diagnosticul incompatibilităţii feto-materne Rh.* În populaţia europeană alela RHD este determinată de deleţia unei regiuni genomice ce conţine gena *RHD*. Femeile gravide Rh^- sunt homozigote pentru deleţie şi deci au un rezultat negativ pentru amplificarea prin PCR a regiunii deletate. O reacţie pozitivă semnifică un făt cu o alelă *RHD* normală (şi fenotip Rh^+), sarcina având în acest caz un risc important de apariţie a incompatibilităţii feto-materne şi necesitând un tratament preventiv. Aceste două aplicaţii sunt deja utilizate în laboratoare de diagnostic din unele ţări.
- *Diagnosticul prenatal al unor boli autozomal* dominante când tatăl este purtătorul alelei mutante. Identificarea alelei mutante (prin PCR) în ADN circulant matern semnifică prezenţa ei la făt şi deci transmiterea bolii.
- Screening-*ul prenatal al bolilor autozomal recesive* când părinţii heterozigoţi sunt purtători de alele mutante diferite. În cazul identificării alelei paterne în ADN circulant matern fătul este fie heterozigot (şi deci nu va manifesta boala), fie heterozigot compus (deci bolnav), cele două situaţii putând fi clarificate numai prin analiza celulelor fetale. Această metodă, deşi nu permite identificarea genotipului fetal, are avantajul de a reduce la jumătate numărul de puncţii, diminuând astfel riscul de avort.
- Utilizarea ADNfl pentru diagnosticul aneuploidiilor fetale este mult mai dificilă deoarece genomul ce conţine anomalia cromozomială este „diluat" în ADN matern normal. Teste de diagnostic au fost puse la punct folosind tehnica de PCR digitală, hibridizarea pe microreţele de ADN, secvenţierea masivă paralelă sau spectrometria de masă dar sunt, pentru moment, doar de domeniul cercetării.

În concluzie, analiza celulelor fetale sau a ADN fetal liber din sângele periferic matern sunt metode care operează la interfața dintre activitatea de cercetare și cea a prestării de servicii medicale. Accelerarea în ultimii ani a ritmului de apariție și de validare a noilor tehnici de diagnostic face probabil ca într-un viitor nu prea îndepărtat aceste tehnologii să dobândească statutul de metode fiabile de diagnostic noninvaziv și să devină o componentă importantă a strategiei de urmărire a sarcinilor.

4. Avantajele DPN

În majoritatea țărilor din Europa, odată cu dezvoltarea planificării familiale a crescut interesul pentru calitatea produsului de concepție și asistența prenatală și perinatală s-au ameliorat considerabil; în acest context *screening*-ul și DPN au devenit unele dintre cele mai solicitate servicii medicale. Astfel, cuplurile cu risc genetic sau malformativ crescut au dobândit o valoroasă opțiune reproductivă: ele vor putea concepe o sarcină știind că prezența sau absența bolii la făt poate fi confirmată prin testare. În peste 95% din cazuri rezultatele DPN sunt normale și, ca urmare, marea majoritate a cuplurilor/gravidelor cu risc vor fi asigurate că viitorul lor copil va fi sănătos, fapt care constituie principalul avantaj al DPN. Într-o mică proporție de cazuri, fetusul va fi serios afectat și, în absența unei terapii prenatale efective, cuplurile pot alege soluția întreruperii sarcinii. Acest lucru va produce, la nivelul populației, un declin al incidenței bolilor genetice severe. DPN este încă o metodă scumpă de diagnostic, dar beneficiile sale pentru familie și populație, ambele interesate în nașterea de copii sănătoși, realizează o relație cost-beneficiu pozitivă. Cu certitudine *screening*-ul și DPN se vor dezvolta în viitor și vor deveni printre cele mai eficace metode de profilaxie ale bolilor genetice.

Bibliografie specifică selectivă

1. Aitken DA, Crossley JA, Spencer K. *Prenatal screening for neural tube defects and aneuploidy*. În Remoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR (ed.). *Principles and Practice of Medical Genetics*. ed. a IV-a. Churchill Livingstone, Londra, Edinbourgh, 2002, 763-401.
2. Benacerraf BR. *The history of the second-trimester sonographic markers for detecting fetal Down syndrome, and their current role in obstetric practice*. Prenat Diagn 2010; 30:644-652.
3. Bianchi DW. *From Michael to microarrays: 30 years of studying fetal cells and nucleic acids in maternal blood*. Prenat Diagn 2010; 30:622-623.
4. Burke W, Coughlin SS *et al. Application of population screening principles to genetic screening for adult-onset conditions*. Genet Test 2001; 5:201-211.
5. Burke W. *Genetic testing*. N Engl J Med 2002; 347:1867-1875.
6. Chodirker BN, Cadrin G, Davies GA *et al. Canadian Guidelines for Prenatal Diagnosis*. J Obstet Gynaecol Can 2001; 23:616-624.
7. Chiu RW, Lo YM. *Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age*. Semin Fetal Neonatal Med 2010.
8. Clague A, Thomas A. *Neonatal biochemical screening for disease*. Clin Chim Acta 2002; 315:99-110.
9. Eik-Nes SH. *The 18-week fetal examination and detection of anomalies*. Prenat Diagn 2010; 30:624-630.
10. Egozcue J, Santalo J, Gimenez C, Perez N, Vidal F. *Primplantation genetic diagnosis*. Mol Cell Endocrinol 2000; 77:21-25.
11. Elias S. *Preimplantation genetic diagnosis by comparative genomic hybrridization*. N Engl J Med 2001; 345:1569-1571.
12. Goel V. *Appraising organized screening programmes for testing for genetic susceptibility to cancer*. BMJ 2001; 322:1174-1178.
13. Guttmacher AE, Collins FS. *Population screening in the age of genomic medicine*. Engl J Med 2003; 348:50-58.
14. Harper JC, Delhanty DA. *Preimplantation genetic diagnosis*. Current Opin Obst Gynec 2000; 12:67-72.
15. Illanes S, Soothill P. *Management of red cell alloimmunisation in pregnancy: the non-invasive monitoring of the disease*. Prenat Diagn 2010; 30:668-673.
16. Kanavakis E, Traeger-Synodinos J. *Preimplantation genetic diagnosis in clinical practice*. J Med Genet 2002; 39:6-11.
17. Nicolaides KH. *Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks*. Prenat Diagn 2011; 31:7-15.
18. Rooney DE. *Human Cytogenetics: Constitutional Analysis. A Practical Approach*. ed. a III-a. Oxford University Press, 2001.
19. Simpson JL. *Preimplantation genetic diagnosis at 20 years*. Prenat Diagn 2010; 30:682-695.
20. Syngelaki A, Chelemen T, Dagklis T, Allan L, Nicolaides KH. *Challenges in the diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities at 11-13 weeks*. Prenat Diagn 2011; 31:90-102.
21. Wald NJ. *The definition of screening*. J Med Screen 2001; 8:1-2.
22. ***. *Newborn screening task Force. Serving the family from birth to the medical home: newborn screening/a blueprint for the future*. Pediatrics 2000; 106:389-442.
23. Wallen J, Beutler E. *Genetic screening for low-penetrance variants in protein-coding genes*. Annual Rev Genomics Hum Genetics 2009; 10:431-450.

Capitolul 20

ABORDĂRI GENETICE ÎN TRATAMENTULUI BOLILOR UMANE

Orice boală umană, fie că are sau nu o componentă genetică importantă în etiologia sa, poate beneficia de o serie de metode terapeutice care implică utilizarea unor tehnologii de manipulare genetică. În plus, aşa cum am prezentat în capitolul 9, genotiparea indivizilor permite în prezent predicţia răspunsului favorabil sau advers la regimurile terapeutice aplicate în anumite boli. Mai mult, medicamentele nou dezvoltate sunt în prealabil testate pe animale, adeseori modificate genetic în scopul modelării unor boli umane.

Având în vedere scopul acestei cărţi, un capitol dedicat tratamentului bolilor, poate fi prezentat din două unghiuri diferite: tratamentul genetic al bolilor şi tratamentul bolilor genetice. Ca urmare, vom aborda succint ambele aspecte: în prima parte vom prezenta progresele recente majore în aplicarea tehnologiilor genetice în tratamentul bolilor umane, iar în partea a doua vom discuta succint câteva principii de terapie a bolilor monogenice.

A. Strategii genetice de terapie a bolilor umane

Cunoştinţele genetice au contribuit major în dezvoltarea unor noi strategii de tratament ale bolilor umane. Aceste strategii cuprind:

- metode de *screening* genetic pentru identificarea unor noi ţinte terapeutice şi dezvoltarea unor medicamente noi;
- producerea de anticorpi, proteine recombinante şi vaccinuri pe bază de inginerie genetică;
- metode de terapie celulară bazate pe manipularea genetică a celulelor stem obţinute de la donatori sau de la pacient;
- terapia genică.

1. Tehnologii genetice de producere a unor noi medicamente

Industria farmaceutică este responsabilă pentru dezvoltarea majorităţii substanţelor chimice utilizate în prezent ca medicamente în tratamentul bolilor umane. Timp de decenii, acest proces a constat în *screening*-ul unui număr imens de molecule mici capabile să amelioreze anumite efecte patogenice. Aceste lanţuri tehnologice încep de regulă cu studii de laborator, ce implică utilizarea de culturi celulare sau modele animale manipulate genetic (caseta 20.1), şi se încheie cu trialuri clinice. Toate aceste activităţi sunt foarte costisitoare şi implică mulţi ani de studii. În plus, multe dintre medicamentele folosite în prezent în tratamentul bolilor umane acţionează doar la nivelul unui număr redus de molecule-ţintă, sunt rareori efective la 100% dintre toţi pacienţii la care sunt prescrise şi pot avea chiar efecte adverse la unii dintre aceştia.

O direcţie nouă asupra căreia este concentrată atenţia multora dintre companiile farmaceutice este dezvoltarea unor noi clase generice de medicamente care nu ţintesc o anumită proteină ci categorii de procese biologice implicate în patogenia a numeroase boli.

Un exemplu este încercarea dezvoltării de medicamente care suprimă codonii stop[1]; astfel, antibioticele aminoglicozidice, precum gentamicina, permit depăşirea de către ribozomi a codonilor stop prematuri în celulele

1. Potenţialul terapeutic al acestor medicamente este imens pentru că 5-70% dintre toate bolile genetice ereditare sunt determinate de mutaţii nonsens care induc terminarea prematură a translaţiei.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 20.1

Metode de *screening* genetic pentru identificarea unor noi ținte terapeutice și dezvoltarea unor medicamente noi

Medicamentele folosite în tratamentul curent al bolilor umane sunt adeseori compuși chimici cu mase moleculare mici obținuți prin extragerea din surse naturale sau prin sinteză chimică. În general, ținta terapeutică este o moleculă sau o structură celulară implicată în procesul patologic de interes asupra căruia acționează medicamentul dezvoltat. În mod tradițional, principalele molecule considerate drept ținte terapeutice sunt proteine. Acestea includ receptori (în special receptorii cuplați cu proteine G), enzime (în special protein kinaze, fosfataze, proteaze) și proteine canal (voltaj-dependente sau ion-dependente). Moleculele terapeutice dezvoltate împotriva acestor proteine țintă pătrund și se leagă de regulă la nivelul unor „depresiuni" de pe suprafața acestora și le modifică activitatea.

Metodele de screening *pentru identificarea unor noi medicamente implică de regulă manipularea complet robotizată a unor colecții de sute de mii sau milioane de compuși chimici care sunt testați individual pentru capacitatea lor de a reacționa cu un anumit tip de material biologic plasat în interiorul unor plăci. Materialul biologic este reprezentat de regulă de culturi celulare, microorganisme sau produse biologice acelulare și modele animale. Izolarea recentă a câtorva linii de celule stem a permis de asemenea diferențierea lor către anumite tipuri specifice de celule. Mai mult, așa cum va fi prezentat în subcapitolul 20.A.3, fibroblaștii izolați prin biopsie cutanată de la orice individ bolnav pot fi reprogramați către celule stem pluripotente și apoi acestea pot fi diferențiate pentru a obține tipul celular dorit pentru* screening *terapeutic.*

Modelele animale folosite în screening*-ul terapeutic (în special șoareci și șobolani) au avantajul că permit studierea efectelor medicamentelor în cadrul unui organism viu și sunt foarte utile înainte de inițierea trialurilor clinice. Cu toate acestea* screening*-ul unui număr mare de substanțe chimice nu este practic și extrem de costisitor pe embrioni de șoareci sau șobolani. Ca urmare, pentru ținte terapeutice care sunt puternic conservate pe scara evoluției sunt folosite în acest scop organisme nevertebrate mici, precum C. elegans sau D. melanogaster. Embrionii de pește (zebrafish – peștele zebră) au avantajul că sunt vertebrate și de asemenea transparenți, permițând utilizarea unor metode de imagistică pe organisme vii.*

eucariote. Cu toate acestea, utilitatea lor clinică în tratamentul bolilor genetice ereditare este foarte redusă datorită capacității lor limitate și a efectelor secundare toxice. *Screening*-ul extensiv al unor colecții ample de molecule mici a permis identificarea **atalurenului**, care permite citirea codonilor stop prematuri, în special UGA, fără afectarea identificării codonilor stop normali și fără efecte toxice marcate.

O altă soluție pentru identificarea a noi ținte terapeutice este exploatarea datelor recente furnizate prin analize la scară de genom, transcriptom și proteom. Aceste metode permit analiza în detaliu a unor căi de semnalizare care intervin în patogenia unor boli. Din cauza simplicității sale, aceste analize la scară largă sunt asociate adeseori cu utilizarea ARNi pentru identificarea acelor gene pentru care un medicament inhibitor ar putea produce un efect util. Studiile de genomică și proteomică a microorganismelor patogene sunt utilizate de asemenea pentru identificarea unor enzime specifice care nu sunt prezente în organismul uman și care le fac susceptibile pentru dezvoltarea unor inhibitori specifici. Alternativ, studiile de proteomică pot conduce la identificarea unor noi proteine pe suprafața organismului patogen care pot deveni apoi ținta unor noi vaccinuri.

2. Producerea de proteine terapeutice prin clonare de expresie

Bolile genetice care sunt rezultatul deficienței unor hormoni sau proteine din plasma sangvină pot fi tratate prin obținerea și administrarea din exterior a proteinei absente. Pentru a asigura o stabilitate și o activitate crescute, proteinele sunt adeseori conjugate cu polietilen glicol (PEG). Acest procedeu crește greutatea lor moleculară, reducând astfel pierderea pe cale renală și prelungind timpul lor de activitate în circulație. Mai mult, conjugarea cu PEG reduce imunogenicitatea proteinelor.

Multe dintre proteinele terapeutice folosite pentru tratamentul bolilor prin deficiențe enzimatice au fost obținute inițial prin extragerea lor din surse animale sau umane. Ele au asociat însă riscuri semnificative precum infecții cu HIV sau virusul hepatitei C etc. Ca urmare, au fost dezvoltate metode de producere a proteinelor terapeutice prin clonare de expresie, prin inserția genei umane codante în interiorul unor organisme simple, precum *Escherichia coli* sau *Saccaromyces cerevisiae*. Prima proteină produsă pe această cale a fost insulina (1982). Alte **proteine recombinante**

obținute prin clonare de expresie și folosite în tratamentul unor boli umane sunt enumerate în tabelul 20.1. Unele proteine simple sintetizate în organismul uman sunt însă glicozilate sau suferă alte modificări complexe post-translaționale care nu pot fi obținute în interiorul microorganismelor utilizate în clonare. De aceea, utilizarea unor sisteme de expresie a proteinelor în interiorul unor celule de mamifere a devenit esențială. Una dintre cele mai folosite linii celulare de acest tip este linia CHO (*Chinese hamster ovary*), utilizată pentru producerea de anticorpi monoclonali sau citokine.

Există însă proteine care sunt necesare în doze terapeutice atât de crescute încât acestea nu pot fi produse cu ușurință în interiorul unor linii celulare sau în bioreactoare microbiene. Pentru aceste cazuri au fost folosite animale transgenice.

O cale care ușurează purificarea proteinei terapeutice este inducerea *secreției acesteia în laptele animalului.* Vectorul de expresie este construit în așa măsură încât proteina umană de interes să fie pusă sub controlul promotorului unei gene care produce în mod normal o proteină din lapte. ADN recombinant este apoi inserat în linia germinală a animalului (capre, porci sau oi) și este transmis în succesiunea generațiilor, conducând la obținerea unor *ferme farmaceutice*. Proteina terapeutică trebuie apoi purificată prin procese secvențiale de cromatografie care conduc în final la un produs cu o puritate de peste 99,99%. Această tehnologie permite obținerea unor proteine în cantități mari și la costuri reduse. De exemplu, o turmă de 150 capre transgenice poate produce cantitatea necesară la nivel global a unei proteine terapeutice[2].

Recent este explorată posibilitatea utilizării altor tipuri de organisme transgenice cu potențial terapeutic sau profilactic pentru boli umane. Un exemplu este dezvoltarea de *orez transgenic* cu conținut crescut în vitamina A pentru a reduce problemele de sănătate publică induse de deficiența sa în cel puțin 26 țări din Africa, Asia și America Latină.

3. Producerea prin inginerie genetică de noi anticorpi și aptameri cu potențial terapeutic

Ingineria genetică a avut un impact major în producerea de noi tipuri de anticorpi terapeutici pentru bolile umane. Fiecare individ deține un repertoriu imens de anticorpi care asigură protecția organismului împotriva antigenelor străine (capitolul 17). Anticorpii au o regiune variabilă care conține situsul de legare la antigen și o regiune constantă prin care interacționează cu molecule efectoare. Legarea anticorpului de antigen poate fi suficientă pentru neutralizarea acestuia (în cazul unor toxine sau virusuri), dar, cel mai adesea declanșează activarea sistemului complement sau a mecanismelor imunitare mediate celular.

Anticorpii terapeutici produși pe cale artificială sunt desemnați a fi specifici față de un singur antigen (monospecifici). **Anticorpii monoclonali** au fost produși inițial prin tehnologia *hibridoamelor*, celule imortalizate obținute prin fuziunea unor limfocite B producătoare de anticorpi (izolate de la șoarece sau șobolan imunizat) cu limfocite B tumorale de șoarece. Hibridoamele au fost apoi folosite sub formă de clone individuale, astfel încât fiecare dintre ele produce în mod permanent și stabil un singur tip de anticorp monoclonal. Potențialul terapeutic al anticorpilor monoclonali produși prin tehnologia hibridoamelor este

Tabelul 20.1. Exemple de proteine terapeutice obținute prin clonare de expresie

Proteina recombinantă	Boala
Insulina	Diabet zaharat
Hormonul de creștere	Nanism hipofizar
Factorul de coagulare VIII	Hemofilie A
Factorul de coagulare IX	Hemofilie B
α-interferon	Leucemie cu celule păroase; hepatită cronică
β-interferon	Scleroză multiplă
γ-interferon	Infecții la pacienți cu boală granulomatoasă cronică
Activatorul tisular al plasminogenului	Boli trombotice
GM-CSF	Neutropenie post-chimioterapie
Leptina	Obezitate
Eritropoietina	Anemie

2. În anul 2009 ATryn (produs de GTC Biotherapeutics) – o antitrombină utilizată în terapia anticoagulantă – a devenit prima proteină terapeutică produsă de un animal transgenic aprobată de FDA.

Tabelul 20.2. Anticorpi monoclonali aprobați FDA pentru utilizare clinică până în anul 2009

Denumire generică	Denumire comercială	Molecula țintă	Tipul de anticorp	Anul aprobării	Boala tratată
Abciximab	ReoPro	Glicoproteina IIb/IIIa	Himeric	1994	Adjuvant în angio-plastia coronariană percutanată transluminală
Adalimumab	Humira	TNF-α	Uman complet	2002	Boala Crohn, artrita reumatoidă
Alemtuzumab	Campath	CD52	Umanizat	2001	Leucemia limfocitară cronică
Basiliximab	Simulect	CD25 (IL2R)	Himeric	1998	Prevenirea rejectelor în transplantele renale
Bevacizumab	Avastin	VEGF	Umanizat	2004	Cancer colorectal
Cetuximab	Erbitux	EGFR	Himeric	2004	Cancere colorectale și orofaciale
Certolizumab pegol	Cimzia	TNF-α	Umanizat	2008	Boala Crohn
Daclizumab	Zenpax	CD25 (IL2R)	Umanizat	1997	Prevenirea rejectelor în transplantele renale
Eculizumab	Soliris	Complement C5	Umanizat	2007	Hemoglobinuria paroxistică nocturnă
Efalizumab	Raptiva	CD11a	Umanizat	2002	Psoriazis
Gemtuzumab	Mylotarg	CD33	Umanizat	2000	Leucemia mielo-blastică acută CD33+
Golimumab	Simponi	ErbB2	Uman complet	2009	Artrite reumatoide și psoriazice, spondilită ankilo-poietică acută
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	CD20	Murin	2002	Limfom non-Hodgkin
Ifliximab	Remicade	TNF-α	Himeric	1998	Boala Crohn, artrita reumatoidă
Muromonab	Orthoclone	CD3	Murin	1986	Prevenirea rejeturilor de transplante
Natalizumab	Tysabri	Intregrina-α4	Umanizat	2006	Scleroza multiplă, boala Crohn
Omalizumab	Xolair	IgE	Umanizat	2004	Astm alergic
Palivizumab	Synagis	Proteina F a RSV	Umanizat	1998	Profilaxia RSV (virusul sincițial respirator)
Ranibizumab	Lucentis	VEGF-A	Umanizat	2006	Degenerare maculară
Rituximab	Rituxan	CD20	Himeric	1997	Limfom non-Hodgkin
Tositumomab	Bexxar	CD20	Murin	2003	Limfom non-Hodgkin
Trastuzumab	Herceptin	ErbB2	Umanizat	1998	Cancer mamar

însă foarte limitat, deoarece au un timp scurt de viață în serul uman, conduc adesea la generarea de anticorpi umani împotriva anticorpilor de șoarece și pot induce chiar boli autoimune.

Pentru creșterea potențialului terapeutic și reducerea efectelor secundare au fost utilizate o serie de tehnici de inginerie genetică prin care o parte sau chiar întreaga secvență a anticorpului de rozător a fost înlocuită cu echivalentul uman al secvenței (figura 20.1). **Anticorpii himerici** mențin secvența regiunii variabile de la șoarece, în timp ce regiunea constantă este înlocuită cu cea umană. **Anticorpii umanizați** sunt o variantă avansată a anticorpilor himerici în care singura secvență de șoarece menținută este cea a regiunii de determinare a complementarității, adică secvența hipervariabilă implicată în legarea directă a antigenului. Mai recent a fost posibilă chiar generarea, prin câteva tehnologii alternative, de **anticorpi umani completi**. De exemplu, prin manipulare genetică au fost generați șoareci la care locii care conțin genele pentru lanțurile grele și ușoare ale imunoglobulinelor au fost deletate în celulele stem embrionice, fiind înlocuite cu un cromozom artificial ce conține genele umane pentru lanțul greu și lanțul ușor tip γ. Acești șoareci produc în exclusivitate anticorpi de tip uman.

O clasă foarte promițătoare de anticorpi terapeutici este cea a **anticorpilor cu un singur lanț de fragmente variabile** (scFv – *single-chain variable fragment*). Acești anticorpi au aproape toate proprietățile privind specificitate de legare a anticorpilor monoclonali, dar sunt alcătuiți dintr-un singur lanț variabil

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

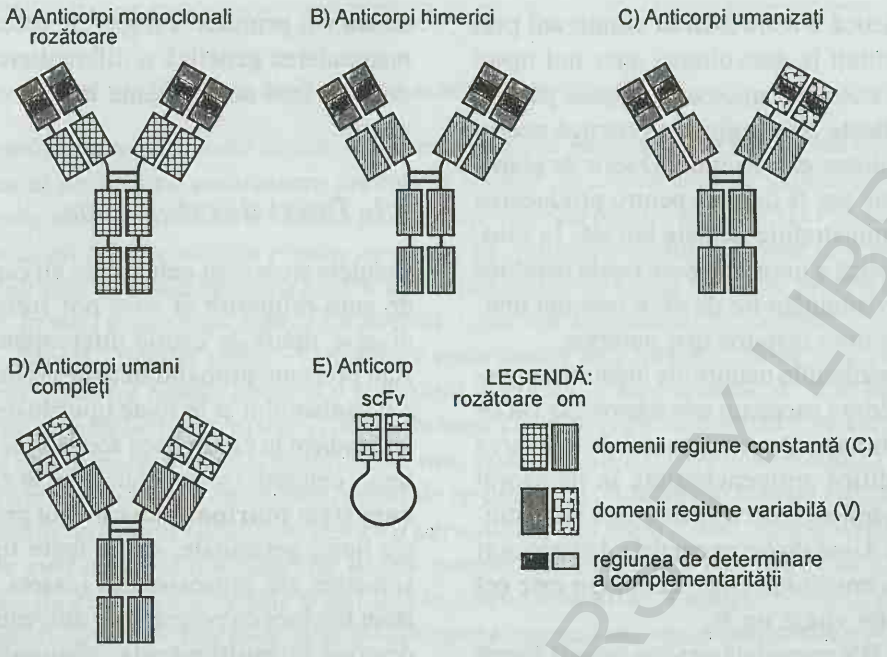


Figura 20.1. Producerea de anticorpi prin inginerie genetică

(după Strachan și Read, 2010)

A) Anticorpi naturali de rozătoare (produși prin tehnica hibridoamelor; B) Anticorpi himerici cu regiunea V de la rozătoare și regiunea C umană; C) Anticorpi umanizați ce păstrează secvența hipervariabilă de la rozătoare; D) Anticorpi umani compleți; E) Anticorpi de cu un fragment monocatenar al regiunii variabile (scFv)

neglicozilat. Ei pot fi produși în cantități crescute în interiorul unor celule bacteriene, de drojdie sau chiar celule de plante. În plus, acești anticorpi au capacitatea de a recunoaște ținte intracelulare (**anticorpi intracelulari** sau **intracorpi**) și pot fi preparați în astfel încât să țintească anumite compartimente ale celulei. Datorită absenței legăturilor disulfidice ce mențin cele patru lanțuri polipeptidice ale unui anticorp standard, intracorpii sunt rezistenți la mediul de regulă puternic reducător din interiorul celulelor. În plus, intracorpii pot lega proteine care de regulă nu pot fi țintite de către medicamente clasice, cum sunt proteinele cu plicaturare anormală implicate în boli neurodegenerative precum Alzheimer, Huntington sau boli induse de prioni.

Primul anticorp monoclonal a fost aprobat FDA în 1986; până în 2009 lista anticorpilor aprobați a crescut la 22 (tabelul 20.2), majoritatea fiind utilizați în tratamentul unor boli autoimune sau în cancer; alte câteva sute aflându-se în diverse stadii preclinice de studiu.

Aptamerii sunt oligonucleotide sau oligopeptide scurte ce leagă și inhibă proteine-țintă specifice cu o afinitate asemănătoare cu cea a anticorpilor. *Aptamerii tip oligonucleotide* sunt dezvoltați pornind cu o colecție de oligonucleotide care sunt apoi supuse mai multor runde de selecție și amplificare utilizând tehnologia SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*). Cu ajutorul acestei tehnologii pot fi obținuți aptameri care inhibă funcția unor proteine intracelulare, dar și a unor proteine extracelulare. Un avantaj al utilizării aptamerilor este acela că, prin adiția unor modificări chimice, poate fi crescută rezistența lor împotriva degradării enzimatice. În plus, aptamerii pot forma interacțiuni mai puternice cu proteinele-țintă decât medicamentele standard. Câțiva aptameri sunt testați în prezent în trialuri preclinice și clinice[3].

4. Producerea de noi vaccinuri prin inginerie genetică

Vaccinurile clasice produse împotriva *bolilor infecțioase* sunt generate prin atenuarea sau uciderea agenților infecțioși (virusuri, bacterii sau fungi) și injectarea lor la pacienți cu scopul stimulării sistemului lor imunitar și al inducerii de anticorpi specifici. Atunci când pacientul vine ulterior în contact cu agentul infecțios, sistemul imunitar este capabil să răspundă viguros și să împiedice dezvoltarea bolii.

3. Primul aptamer aprobat FDA este Pegaptanil (Macugen), folosit în tratamentul degenerării maculare neovasculare, principala cauză de cecitate la adulți. Pegaptanil leagă și inhibă VEGF (factorul de creștere vasculară endotelială) ce induce formarea unor noi vase capilare care sângerează și induc pierderea acuității vizuale.

Ingineria genetică a contribuit în ultimii ani prin mai multe modalități la dezvoltarea unor noi tipuri de vaccinuri. De exemplu, microorganismele patogenice pot fi modificate prin inginerie genetică pentru a fi atenuate și utilizate ca vaccinuri. O serie de plante modificate genetic pot fi folosite pentru producerea de vaccinuri administrabile pe cale bucală. În plus, modificarea genetică a unor antigene poate conduce la îmbunătățirea vizibilității lor de către sistemul imunitar și obținerea unui răspuns mai puternic.

Una dintre contribuțiile majore ale ingineriei genetice în generarea de noi vaccinuri este tehnologia **vaccinurilor recombinante**. Aceasta constă în inserarea genelor care codifică antigenele-țintă în interiorul unor virusuri cu virulență foarte redusă care sunt utilizate drept vectori. Unul dintre exemplele de vaccinuri obținute prin intermediul acestei tehnologii este cel împotriva hepatitei virale tip B.

Vaccinurile ADN reprezintă cea mai recentă formă de vaccinuri. Ca și în cazul vaccinurilor recombinante, genele care codifică antigenele-țintă sunt mai întâi clonate. ADN este apoi injectat direct intramuscular cu ajutorul unor pistoale cu gaz comprimat, facilitând astfel pătrunderea ADN în interiorul celulelor musculare. Antigenele patogene vor fi apoi exprimate de către celulele musculare și de unele celule dendritice și vor induce răspuns imunitar de tip umoral și celular. Trialurile clinice efectuate până în prezent au demonstrat că vaccinurile ADN sunt bine tolerate și sigure.

În afara bolilor infecțioase, *cancerele* reprezintă o altă categorie de boli care se pretează pentru dezvoltarea de vaccinuri. În plus, unele tipuri de cancere sunt produse de agenți infecțioși, așa cum sunt cancerele hepatice produse de virusul hepatitic B sau cancerele cervicale produse de virusul *Papilloma* uman. Vaccinurile produse împotriva acestor virusuri sunt utilizate cu succes în scop profilactic. Pe lângă aceste vaccinuri profilactice au fost însă dezvoltate și o serie de vaccinuri terapeutice, folosite pentru tratamentul unor cancere diagnosticate. Mai multe detalii despre aceste tipuri de vaccinuri vor fi prezentate în partea a doua a acestui capitol.

5. Metode de terapie bazate pe manipularea genetică a celulelor stem

Transplantele de organ folosite extensiv în prezent înlocuiesc organele nefuncționale ale pacienților cu altele sănătoase de la donatori compatibili. Există însă un deficit constant de donatori, la care se adaugă și problemele de incompatibilitate imunologică între donator și primitor. Progresele recente în obținerea, manipularea genetică și diferențierea celulelor stem deschid însă noi speranțe în tratamentul unor boli umane.

5.1. Tipuri de celule stem

Celulele stem sunt celule care au capacitate crescută de auto-reînnoire și care pot forma de asemenea diverse tipuri de celule diferențiate. Celulele stem sunt prezente probabil în toate etapele de dezvoltare a organismului și în toate tipurile de țesuturi. Există un gradient în capacitatea acestora de a genera diverse tipuri celulare (plasticitate), de la **celulele embrionare stem pluripotente** care pot produce atât celule ale liniei germinale, cât și toate tipurile de celule somatice ale organismului (caseta 20.2), la **celule stem tisulare** cu potențial de diferențiere mai restrâns, descrise ca **multipotente, oligopotente** sau **unipotente**.

Celulele embrionare stem pluripotente sunt obținute în stadii precoce de dezvoltare embrionară, când celulele sunt în mod natural încă nespecializate. Mai târziu, atunci când țesuturile se formează, celulele devin din ce în ce mai specializate. Fiecare țesut menține însă un număr de celule stem tisulare care vor asigura regenerarea continuă a celulelor diferențiate precum celulele sangvine, celulele tegumentare sau celulele epiteliale intestinale, pe măsură ce acestea mor și sunt eliminate.

5.2. Dificultăți practice în terapia cu celule stem

Terapia cu celule stem este îngreunată în prezent de numeroase limite practice precum capacitatea redusă de creștere a celulelor stem în cultură, controlul eficient al diferențierii către tipul celular dorit, eliberarea celulelor terapeutice în poziția anatomică dorită și asigurarea unei funcții normale. Definirea bazelor moleculare care permite diferențierea celulelor stem de alte celule înrudite a fost una dificilă, în special datorită capacității limitate de a obține celule stem cu puritate foarte crescută. Cunoștințele legate de factorii care controlează diferențierea celulelor stem sunt încă reduse. Ca urmare, câteva dintre trialurile clinice actuale constau în simpla injectare a unor preparate cu celule stem direct la nivelul organului afectat, în speranța că țesutul gazdă va asigura semnalele necesare care să ghideze diferențierea corectă a celulelor stem către tipul celular dorit.

Anumite boli și tipuri de țesuturi sunt mult mai puțin potrivite unor metode de terapie celulară. Bolile de sânge sau arsurile cutanate sunt așteptate să pună

CASETA 20.2

Celulele embrionare stem pluripotente

***Celulele stem embrionare** (ES) sunt izolate din masa celulară internă (ICM –* internal cell mass*) în stadiul de blastocist al dezvoltării embrionare precoce. Celulele ES umane au fost izolate pentru prima dată în 1998, în urma unor metode de terapie a infertilității prin fertilizare* in vitro *(IVF); surplusul de embrioni produs în acest fel este utilizat pentru cercetare cu consimțământul informat al donatoarei.*

*Blastociștii izolați sunt apoi dezagregați pentru a permite celulelor masei celulare interne să crească în placa de cultură. În mod tradițional suprafața internă a plăcilor de cultură este acoperită mai întâi cu un strat de celule „bavetă" (*feeder cells*) – fibroblaste embrionare de șoarece care au fost tratați astfel încât să nu se dividă. Celulele bavetă asigură o suprafață aderentă la care celulele ICM se pot atașa și, în plus, secretă o serie de factori de creștere și alte substanțe chimice care stimulează creșterea celulelor ICM. Celulele ICM care supraviețuiesc și proliferează sunt apoi colectate și repuse pe noi plăci de cultură și sunt supuse ulterior la numeroase asemenea cicluri de re-placare și subcultură numite pasaje. Celulele care continuă să prolifereze după subculturi pentru o perioadă de cel puțin 6 luni, care dovedesc că sunt pluripotente și care sunt normale din punct de vedere genetic vor constitui o nouă linie de celule ES.*

*Pluripotența unei linii celulare ES poate fi validată în câteva modalități. Celulele ES pot fi diferențiate în țesuturi corespunzătoare celor trei foițe embrionare care formează un organism (endoderm, mezodem și ectoderm). O asemenea modalitate este creșterea celulelor ES în culturi în suspensie. În asemenea condiții, celulele ES agregă în mod spontan și se diferențiază în așa-numiții **corpusculi embrioizi** (*embryoid bodies*) care conțin celule ale tuturor celor trei straturi germinale. Un test mult mai riguros de verificare a pluripotenței este însă injectarea celulelor ES la șoareci imunodeficienți pentru a induce formarea de teratoame (tumori benigne care conțin țesuturi derivate din cele trei foițe embrionare asociate în mod haotic).*

mai puține dificultăți tehnice decât bolile neurodegenerative. O altă considerație este complexitatea arhitecturală și funcțională a țesutului care se dorește a fi înlocuit. De exemplu, terapia de înlocuire în cazul unor boli hepatice sau cardiace ar putea fi facilitată de structurile relativ simple ale acestor organe. În contrast, diabetul pune mai multe probleme deoarece insulele Langerhans au o structură complexă, iar celulele beta care produc insulină sunt doar unul din cele cinci tipuri diferite de celule prezente în aceste structuri. Mai mult, insulele Langerhans sunt subiectul unor mecanisme foarte complexe de reglare.

Terapia cu celule ES ridică și o serie de *probleme de siguranță*. De exemplu, pluripotența celulelor ES implică în sine riscul ca unele dintre aceste celule să dea naștere unor tumori. Ca urmare, metodele de diferențiere trebuie să fie maximizate astfel încât numărul celulelor stem nediferențiate rămase după administrare să fie minim. Celulele ES ca și alte tipuri de celule stem pot prezenta instabilitate cromozomială dacă sunt cultivate pentru perioade foarte lungi.

O altă problemă este aceea a *incompatibilității imunologice* între donator și acceptor în cazul folosirii unor celule alogenetice. Cu excepția unor situsuri imunologice privilegiate (precum creierul, corneea și camera anterioară a ochiului), celelalte organe posedă un risc crescut de eliminare a celulelor donor. Pentru a contracara această problemă, celulele stem pot fi modificate genetic pentru a deveni mai puțin vizibile în fața sistemului imunitar al organismului recipient. Odată cu apariția și dezvoltarea băncilor de celule stem, există posibilitatea utilizării unor linii de celule ES care sunt compatibile din punct de vedere HLA cu celulele acceptorului. O altă modalitate este însă terapia autologă, cu celule stem obținute de la pacient. O posibilă cale în acest scop este convertirea unor celule non-stem în celule stem prin reprogramare. Aceasta este o modalitate care se extinde rapid în prezent și care va fi descrisă mai jos. O altă cale este de a crește în mod artificial capacitatea de mobilizare și diferențiere a celulelor stem existente în organism. Această funcție este foarte eficientă la făt și în primii ani de viață. Cu vârsta însă capacitatea de regenerare devine tot mai limitată. Dezvoltarea unor metode artificiale de stimulare a răspunsului celulelor stem este în prezent intens cercetată[4].

5.3. Metode de reprogramare nucleară

În principiu, terapia celulară autologă poate fi realizată numai prin reprogramarea celulelor obținute de la

4. În anul 2009 a fost raportată obținerea unei rate de peste 100 de ori de mobilizare a celulelor progenitor mezenchimale și endoteliale la șoarecii tratați cu medicamentul Mozobil, alături de un factor de creștere.

pacient, astfel încât acestea să fie convertite în tipul celular de care pacientul are nevoie. Pentru aceasta sunt mai întâi extrase celule uşor accesibile, precum fibroblaste tegumentari, după care sunt manipulate în culturi celulare pentru a schimba statusul lor de diferenţiere. Până recent se credea că procesul prin care celulele devin progresiv tot mai specializate în cursul etapelor de dezvoltare este unul ireversibil. Succesul experimentului de clonare al oii Dolly, prin care nucleul unei celule somatice a fost reprogramat, dând naştere unei celule totipotente, a schimbat acest punct de vedere.

Reprogramarea nucleară implică alterarea expresiei genice cu inducerea unei modificări profunde a statusului de diferenţiere celulară. De exemplu, consecinţa reprogramării nucleare poate fi regresia unei celule somatice la statusul de celulă progenitoare pluripotentă de tip embrionar (*dediferenţiere*), sau transformarea unei celule diferenţiate într-un alt tip de celulă diferenţiată (*transdiferenţiere*). Fertilizarea ovocitului constituie un exemplu natural de reprogramare nucleară: spermatozoidul este o celulă foarte specializată, iar nucleul său este puternic condensat până în momentul în care este reprogramat de către factorii prezenţi în ovocit.

Au fost dezvoltate câteva modalităţi experimentale de reprogramare nucleară (figura 20.2):

a) Transferul nuclear

Primele experimente care au condus la reversia statusului de diferenţiere a unor celule de vertebrate au fost efectuate pe broască cu peste 40 de ani în urmă.

Prin utilizarea unor metode de microchirurgie au fost izolaţi nucleii unor celule specializate care au fost apoi transplantaţi în ovocite nefertilizate enucleate sau inactivate anterior prin iradiere. Această metodă a permis reprogramarea nucleului celulei somatice transformându-l într-unul totipotent. Broaştele obţinute prin transferul de nuclei somatici de la un singur individ au fost considerate a fi *clone* identice din punct de vedere genetic cu organismul donor.

Aceste experimente au arătat că este posibilă reversia completă a diferenţierii celulare la vertebrate. Cu toate acestea amfibienii erau considerate organisme excepţionale; de exemplu, salamandrele au capacitatea de a regenera membre sau coada amputate. Prin comparaţie, capacitatea de regenerare la mamifere este extrem de limitată. De aceea, perspectiva reprogramării nucleare a fost de mulţi considerată imposibilă până la naşterea oii clonate Dolly în 1996.

Clonarea oii Dolly a fost posibilă prin izolarea de nuclei din celulele glandelor mamare a unei oi Finn-Dorset (blana albă) care au fost apoi transplantaţi individual în ovocitele enuclate ale unei oi Scottish blackface

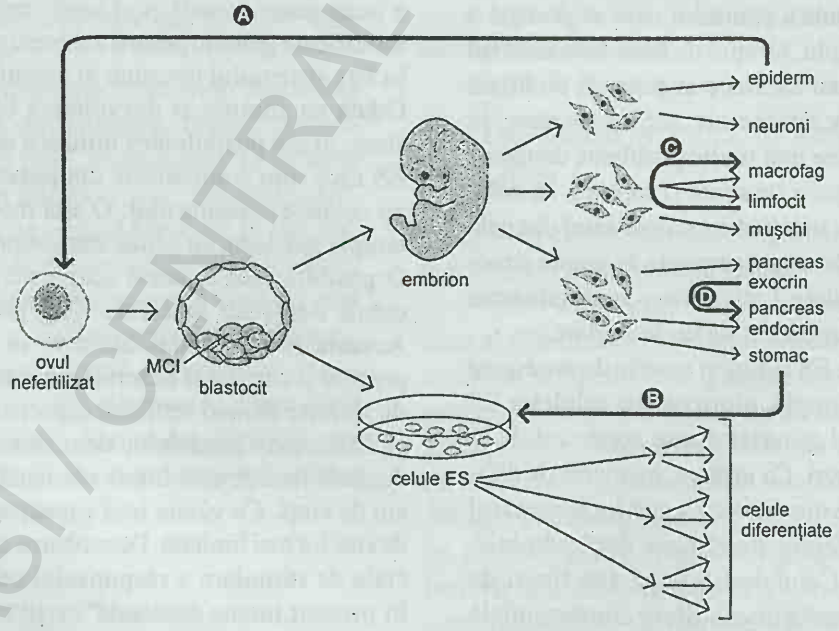


Figura 20.2. Modalităţi experimentale de reprogramare nucleară la mamifere

(după Strachan şi Read, 2010)

Etapele normale în dezvoltare şi diferenţiere tisulară sunt indicate prin linii punctate
A. Transferul nuclear într-un ovocit nefertilizat enucleat reprogramează nucleul celulei somatice să se dediferenţieze şi să producă o celulă embrionară totipotentă. B. o celulă somatică este stimulată să se dediferenţieze şi să devină o celulă stem pluripotentă care se aseamănă cu celulele stem embrionare C. Reprogramarea unei celule somatice care devine celulă stem pluripotentă indusă ce va urma apoi o altă cale de diferenţiere. D. Transdiferenţierea prin conversie directă a unui tip de celulă diferenţiată într-un alt tip înrudit

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(blana albă pe corp, dar neagră la nivelul capului). În una dintre cele 434 încercări factorii prezenți în citoplasma ovocitului au condus cumva la reprogramarea nucleului somatic către statusul totipotent. Celula rezultată a fost apoi stimulată *in vitro* să se dezvolte până la stadiul de blastocist și apoi a fost implantată în uterul unei oi Scottish blackface pentru a da naștere lui Dolly.

Deși mult mai dificil din punct de vedere tehnic, succesul clonării oii Dolly a condus ulterior la clonarea cu succes la multe alte tipuri de mamifere, precum bovine, șoareci, pisici, câini, iepuri, capre, porci și cai. Mamiferele clonate până în prezent au dovedit a prezenta însă o incidență foarte crescută a unor anomalii, cel mai probabil datorită reprogramării incomplete a unor modificări epigenetice. Acest aspect este unul dintre argumentele puternice folosite împotriva clonării artificiale umane, subiect al unor puternice dezbateri etice și legislative (caseta 20.3).

b) Fuziunea celulară

Două celule diferite pot fi induse să fuzioneze, formând o singură celulă cu doi nuclei diferiți numită ***heterokarion***. Prin utilizarea unor inhibitori ai diviziunii celulare, cei doi nuclei ai heterokarionului pot fi menținuți separați. În acest fel, fiecare nucleu este subiect al reglării de către factori care în mod normal reglează expresia genică în celălalt tip de nucleu. Unul dintre cei doi nuclei, de regulă cel mai mare și provenind din celule care se divid mai intens, reprogramează eventual celălalt nucleu, forțându-l să adopte un model de expresie genică asemănător. Ca urmare, dacă o celulă ES pluripotentă este fuzionată cu o celulă somatică, nucleul acesteia din urmă va fi reprogramat către un status pluripotent.

c) Reprogramarea cu factori de transcripție specifici

Faptul că nucleii celulelor somatice pot fi dediferențiați a condus la o cercetare intensă pentru identificarea factorilor responsabili pentru acest proces. În anul 2006 a fost raportat pentru prima dată că transfecția a doar patru factori de transcripție (Oct3/4, Sox2, c-Myc și Klf4) este suficientă pentru a reprograma fibroblaștii de șoarece în celule pluripotente. La scurt timp rezultate similare au fost obținute la om, precum și prin utilizarea a diverse alte tipuri de celule somatice. Celulele reprogramate obținute prin

CASETA 20.3

Etica clonării artificiale umane

*Deși clonele umane naturale (gemenii sau tripleții monozigoți) sunt destul de frecvente, clonarea artificială umană în scop reproductiv (**clonarea reproductivă**) este considerată nejustificabilă din punct de vedere etic și este ilegală în numeroase țări. Aceste considerații etice sunt extinse inclusiv în cazurile în care clonarea terapeutică ar putea oferi o opțiune de a avea copii sănătoși pentru unele cupluri cu risc complet de boală. De exemplu, femeile cu boli mitocondriale severe ar putea evita transmiterea bolii prin utilizarea unor ovocite donate enucleate în care este apoi transplantat un nucleu somatic izolat de la ea sau de la partenerul său. Tehnologia ar putea fi de asemenea folosită în unele circumstanțe speciale, precum clonarea unor membri ai familiei decedați în urma unor circumstanțe tragice. Principalele argumente folosite împotriva clonării reproductive sunt rata scăzută de succes în toate experimentele de clonare efectuate la mamifere și faptul că multe din animalele clonate se nasc cu anomalii severe, probabil datorită unor defecte în reprogramarea informației epigenetice. Chiar însă dacă tehnologia de clonare reproductivă ar deveni perfect eficientă și sigură rămâne un al doilea argument etic major – acela că viața unui om trebuie evaluată pentru ea însăși și nu tratată ca un instrument de atingere a unui scop.*

*Cu toate aceste probleme etice, transferul de nuclei ai unor celule somatice a oferit pentru prima dată posibilitatea obținerii de linii celulare ES de la orice pacient care acceptă donarea unor celule ușor accesibile precum fibroblaste tegumentari. Nucleii acestor celule somatice sunt mai întâi izolați și apoi inserați în ovocite nefertilizate donate și ulterior enucleate. Celulele care rezultă sunt apoi stimulate pentru a se dezvolta în blastociști, utilizați apoi pentru izolarea de celule ES. Această aplicație este cunoscută sub numele de **clonare terapeutică**. Clonarea terapeutică este de asemenea controversată. Principalele argumente împotriva utilizării sale sunt: distrugerea unui ovovit uman nefertilizat și facilitarea clonării reproductive. În plus, obținerea de ovocite de la donori umani presupune utilizarea unor proceduri invazive și potențial periculoase. Contra-argumentul principal folosit de susținătorii acestor tehnologii este posibilitatea obținerii de celule ES specifice fiecărui pacient, ce pot fi folosite apoi pentru diferențierea către tipul de celule necesare tratării bolii în cauză. În practică însă această tehnologie s-a dovedit a fi foarte ineficientă. În plus, dezvoltarea recentă a metodelor de reprogramare cu factori de transcripție specifici face tot mai puțin improbabilă utilizarea în viitor a acestei tehnologii.*

această metodă au fost denumite ***celule stem pluripotente induse*** (iPS – *induced pluripotent stem cells*), deoarece erau foarte asemănătoare cu celulele ES (figura 20.3). La fel ca celulele ES, celulele iPS au telomerază activă, reactivarea genelor ce asigură statusul de pluripotență și sunt asemănătoare din punct de vedere epigenetic și transcripțional. În plus, celulele iPS au putut fi folosite cu succes la șoarece pentru obținerea de noi progenituri, indicând contribuția lor la formarea liniei celulelor germinale în organisme himeră. Câteva succese de ultimă oră au permis: 1) formularea unor combinații noi de factori de reprogramare care exclud c-Myc (care are riscul de a induce tumori) (de exemplu Oct4 + Klf4 + Lin28 + Nanog sau Oct4 + Klf4 + Nanog sau Oct4 + Sox2 + Klf4 + Acid Valproic etc.); 2) înlocuirea vectorilor retrovirali sau lentivirali folosiți inițial cu vectori adenovirali sau plasmizi sau chiar reprogramarea cu proteine recombinate (excluzând astfel riscul de mutageneză inserțională); 3) obținerea de iPS specifice pentru diverse boli umane care oferă avantajul unor noi sisteme de studiu a bolilor respective și de *screening* a unor noi metode terapeutice.

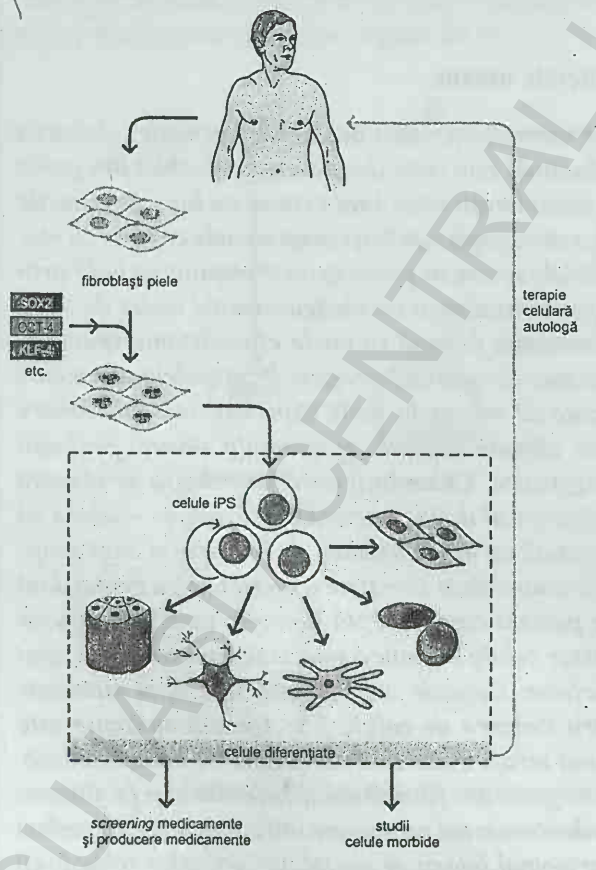


Figura 20.3. Celule stem pluripotente induse
(după Strachan și Read, 2010)
SOX-2, OCT-4, KLF-4 sunt factori de transcripție

d) Transdiferențierea

Expresia ectopică a unui factor de transcripție sau a unei combinații de factori de transcripție poate conduce la conversia unui tip diferențiat de celulă într-un alt tip de celulă diferențiată, dar înrudită. De exemplu, transfecția genelor pentru trei factori de transcripție (Ngn3, Pdx1 și Mafa) este suficientă pentru conversia celulelor pancreatice exocrine adulte în celule de tip beta, producătoare de insulină.

5.4. Aplicații terapeutice ale metodelor de reprogramare nucleară

Cu toate dificultățile tehnice descrise mai sus, terapia cu celule stem (numită mai recent și *inginerie tisulară*) este în prezent una dintre cele mai intens studiate și rapid dezvoltate tehnologii în cadrul unei noi ramuri a medicinii numită **medicina regenerativă**. Cea mai eficientă utilizare a terapiei cu celule stem până în prezent este transplantul cu măduvă osoasă sau celule sangvine din cordonul ombilical în leucemii și limfoame. Deoarece celulele stem hematopoietice sunt ușor de obținut, o serie de alte boli de sânge au devenit de asemenea țința unor metode de terapie cu celule stem.

6. Terapia genică

Terapia genică presupune modificarea directă a genomului unor celule ale pacientului în scopul obținerii unui efect terapeutic. În funcție de tipul celular țintit de terapia genică, aceasta poate fi *terapie genică somatică* sau *terapie genică germinală*. Aceasta din urmă presupune modificarea genetică a unui gamet sau a zigotului și are capacitatea de a fi transmisă la urmași. De aceea, terapia genică germinală este considerată ca nefiind etică la om și singurele protocoale de terapie genică aprobate sunt cele de terapie somatică. În cadrul protocoalelor de terapie genică somatică, celulele țintite sunt cel mai adesea cele implicate direct în procesul patogenic. O excepție notabilă este aceea a cancerului în care terapia genică țintește uneori celulele sistemului imunitar, cu scopul de a crește capacitatea lor de recunoaștere și luptă împotriva celulelor tumorale.

În funcție de boala în cauză, celulele somatice pot fi modificate în câteva modalități diferite (figura 20.4):

- *Amplificarea genică* sau *adiția genică* are ca scop introducerea unei copii funcționale a unei gene ce nu funcționează în tipul celular afectat de boală (figura 20.4.A). Acest tip de terapie poate fi aplicat bolilor genetice produse prin mutații cu pierderea funcției (precum fibroza chistică), cu excepția acelor

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

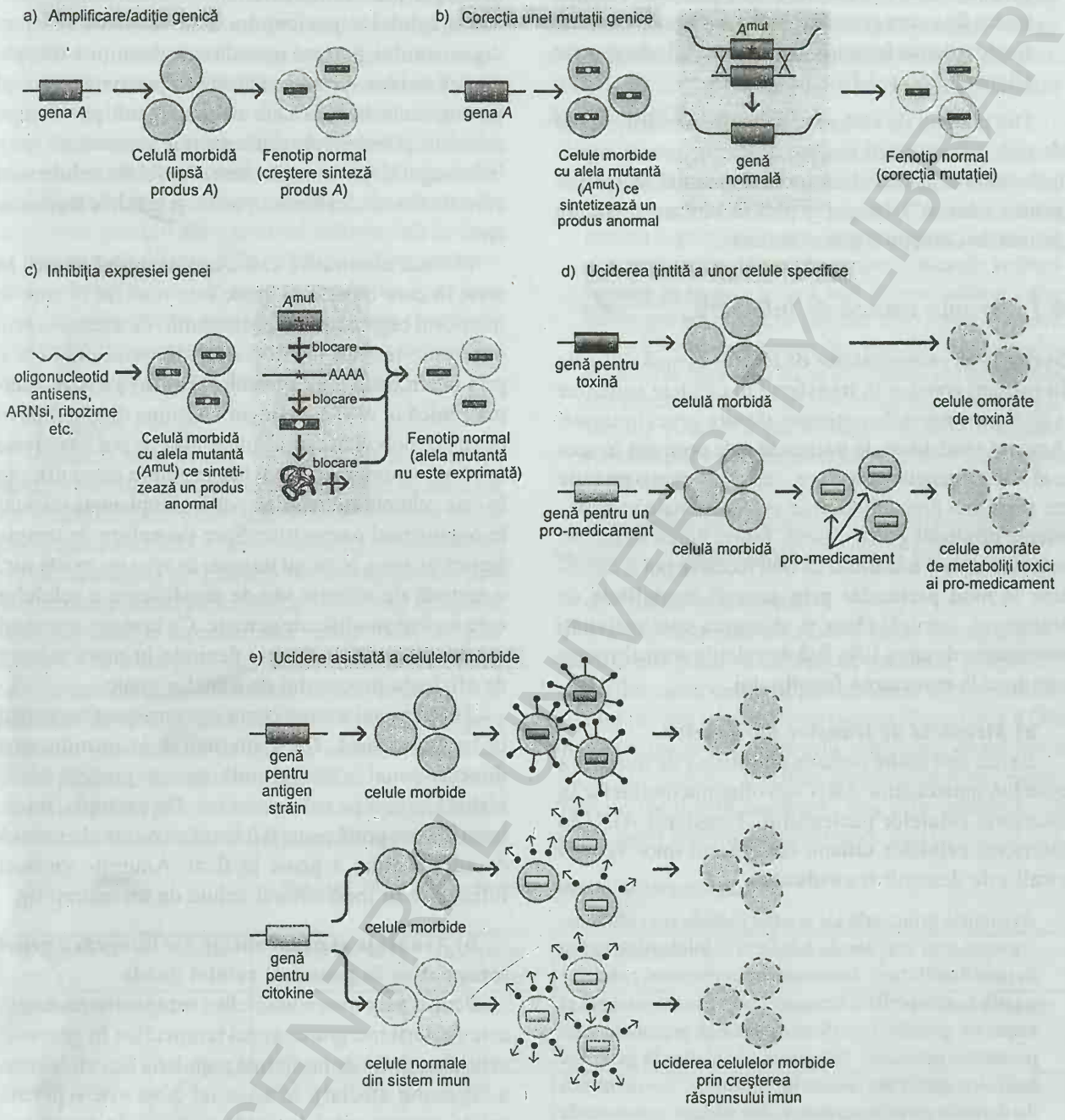


Figura 20.4. Strategii de terapie genică
(după Strachan și Read, 2010)

boli în care efectul mutației conduce la afectarea ireversibilă a celulelor înainte ca terapia genică să poată fi aplicată (de exemplu, în cazul anomaliilor congenitale). Adiția genică poate fi de asemenea aplicată în cancer, prin introducerea unei copii normale a unor gene supresoare de tumori care sunt afectate de mutații.

- *Corecția unor mutații patogenice*, cu scopul restaurării funcției genei mutante, este necesară în cazul bolilor produse prin mutații cu câștig de funcție (figura 20.4.B). Gena mutantă poate fi reparată la nivel ADN prin înlocuirea secvenței care conține mutația cu o secvență normală, dar și prin inducerea alterării matisării genei în așa fel încât exonul care conține mutația patogenă să fie sărit.
- *Inhibiția țintită a expresiei genice* este utilizată în special în cazul bolilor infecțioase sau în cancer în cazul oncogenelor (figura 20.4.C). Alte aplicații ar putea fi reducerea expresiei unor gene responsabile de inducerea unor boli autoimune sau atenuarea expresiei unor alele produse de mutații cu câștig de funcție.
- *Uciderea țintită a unor celule specifice* este aplicată în mod particular în cancer și este obținută fie

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

prin introducerea în celule a unor gene care codifică toxine fie a unor gene care induc un răspuns imunitar foarte puternic împotriva celulei modificate genetic (figura 20.4.D şi E).

Din punctul de vedere al scopului urmărit, se pot deosebi trei categorii majore de terapie genică somatică: terapia genică de înlocuire (numită şi terapia genică „clasică"), terapia genică de blocare şi terapia genică de corecţie a genei mutante.

6.1. Terapia genică de înlocuire

Majoritatea protocoalelor de terapie genică utilizate în prezent constau în transferul în celulele somatice a unei gene normale corespunzătoare genei mutante. Această modalitate de tratament este potrivită în special bolilor genetice recesive, care presupun o mutaţie cu pierderea funcţiei; inserţia genei normale va suplimenta produsul genic absent. Multe dintre deficientele enzimatice transmise ca boli recesive pot fi corectate în mod particular prin această modalitate de tratament, întrucât chiar şi atingerea unei activităţi enzimatice de circa 10% faţă de valorile normale poate conduce la corectarea fenotipului.

a) Metodele de transfer ale genelor

Există mai multe metode alternative de transfer a genelor, moleculelor ARN sau oligonucleotidelor în interiorul celulelor pacientului. Transferul ADN în interiorul celulelor umane cu ajutorul unor vectori virali este denumit **transducţie**.

Avantajele principale ale acestei metode sunt eficienţa crescută a virusurilor de a infecta celulele (dobândită în cursul evoluţiei), inserarea lor în genomul celulelor gazdă (caracteristică numai anumitor virusuri) şi expresia genelor transferate (datorită prezenţei unor promotori puternici). Integrarea virusurilor în genomul celulelor gazdă are avantajul asigurării unei expresii de durată a genei transferate, dar adaugă şi o serie de riscuri legate de sediul de integrare.

Alteori, transferul genelor, moleculelor ARN sau oligonucleotidelor în interiorul celulelor pacientului poate fi făcută fără ajutorul unor virusuri, procedeu numit **transfecţie**. În asemenea cazuri nu există riscuri legate de integrarea ADN exogen în genom, în schimb eficienţa transfecţiei este de regulă redusă.

În multe protocoale de terapie genică celulele-ţintă sunt mai întâi extrase din organismul pacientului, multiplicate în cultură şi apoi modificate genetic prin transferul acidului nucleic dorit. Astfel de celule pot fi analizate extensiv pentru identificarea acelora care sunt purtătoare ale modificării genetice dorite (de regulă prin utilizare unor metode de selecţie). Celulele selectate sunt amplificate şi apoi sunt injectate înapoi în corpul pacientului. Deoarece modificarea genetică a celulelor pacientului este realizată în afara organismului, această metodă este denumită **terapie genică *ex vivo***. Această metodă este potrivită în special pentru acele boli în care celulele-ţintă pot fi uşor accesate şi îndepărtate şi care pot supravieţui timp îndelungat după transplantare. Astfel de celule sunt cele ale sistemului hematopoietic şi celulele tegumentare.

Metoda alternativă este cea a **terapiei genice *in vivo***, în care transferul genic este realizat *in situ*, în interiorul organismului pacientului, de exemplu prin injectarea într-un organ (creier, muşchi, ochi etc.), prin intermediul unor aerosoli (plămân) ş.a.m.d. Terapia genică *in vivo* este singura opţiune disponibilă în cazul acelor boli în care celulele-ţintă nu pot fi cultivate *in vitro* în număr suficient (de exemplu neuroni), sau în care celulele cultivate nu pot fi reimplantate eficient în organismul pacienţilor. Spre deosebire de terapia genică *ex vivo*, în cazul terapiei *in vivo* nu există nici o metodă de selecţie sau de amplificare a celulelor care au fost modificate genetic. Ca urmare, succesul acestor metode de terapie depinde în mare măsură de eficienţa procesului de transfer genic.

Ţintirea unui anumit organ este un aspect important în terapia genică. Ca o alternativă la introducerea directă a genei în ţesutul-ţintă, aceasta poate fi administrată uneori pe cale sistemică. De exemplu, injectarea în vena portă poate fi folosită ca o cale alternativă de administrare a genei în ficat. Anumite virusuri infectează în mod natural celule de un anumit tip.

b) Avantaje şi dezavantaje ale integrării genei terapeutice în genomul celulei gazdă

Pentru asigurarea unui efect terapeutic de durată este de dorit integrarea genei terapeutice în genomul celulelor-ţintă (de preferinţă populaţia de celule stem a organului afectat). În acest fel gena este replicată ori de câte ori celulele gazdă se divid. În prezent se folosesc câteva tipuri de vectori virali care asigură integrarea intracromozomială a genei terapeutice. Majoritatea acestor virusuri se integrează însă la întâmplare în genom şi, ca urmare, diferite celule au gena inserată în poziţii diferite ale unor cromozomi. Integrarea virusului în anumite poziţii ale unor cromozomi (regiuni heterocromatice) poate conduce la expresia de scurtă durată, expresia redusă, sau chiar absenţa completă a expresiei genei terapeutice. Integrarea întâmplătoare a virusurilor în genom asociază de asemenea riscuri semnificative legate de alterarea expresiei unor gene endogene (inactivarea genei prin inserţia în interiorul acestora). Riscul cel mai important este însă acela al activării prin inserţie a unor protooncogene şi inducerea apariţiei unor cancere.

Sistemele de administrare a genelor în care ADN nu se integrează în interiorul genomului celulei gazdă, devenind epizomi extracromozomali, nu asociază riscurile de integrare menționate mai sus. În schimb, dezavantajul lor major este durata limitată a expresiei genei transferate. Atunci când celula gazdă se divide, epizomul extracromozomal nu se replică și este transferat doar uneia dintre celulele fiice. Ca urmare, în cazul unor țesuturi care se divid activ există în timp un fenomen de diluare și de reducere a efectului terapeutic. Acest sistem de tratament este însă preferat în cazurile în care nu este necesar un efect terapeutic de durată (de exemplu, terapia genică a cancerului sau a unor boli infecțioase).

c) Vectori virali

Virusurile sunt sisteme extrem de eficiente de eliberare a genelor în interiorul celulelor. Ele se atașează la suprafața celulelor țintă prin intermediul unor receptori proteici specifici. Unele virusuri au tropism larg, având capacitatea de a infecta diverse tipuri celulare. Altele, dimpotrivă, se leagă la nivelul unor receptori exprimați doar pe suprafața unui număr redus de tipuri celulare (de exemplu, virusul herpetic are tropism doar pentru celulele sistemului nervos central). Tropismul natural al virusurilor poate fi modificat prin inginerie genetică în funcție de scopul terapeutic. Odată pătrunse în celulele-țintă, anumite virusuri au capacitatea de a pătrunde direct în nucleu, prin intermediul porilor membranei nucleare (ca urmare, aceste virusuri pot infecta celule care nu se divid), în timp ce altele pot accesa compartimentul nuclear numai după dizolvarea membranei nucleare în cursul mitozei. Virusurile cu genom mare pot accepta inserția unor secvențe ADN mai lungi.

Cu toate acestea, deoarece genomul unui virus este de regulă foarte compactat în interiorul unui înveliș proteic, inserția secvenței ADN terapeutice necesită adesea excizia în prealabil a unor componente neesențiale ale genomului viral. Mai mult, deoarece anumite virusuri folosite în terapia genică sunt în mod natural patogenice sau pot induce un răspuns imun puternic, adesea este necesară modificarea lor genetică (de exemplu, inactivarea capacității lor de a se replica sau de a induce un răspuns imun). Uneori însă aceste caracteristici naturale ale virusurilor pot fi folosite în scop terapeutic (de exemplu, virusurile oncolitice folosite în tratamentul cancerelor).

Principalele caracteristici ale vectorilor virali folosiți în terapia genică sunt prezentate în tabelul 20.3.

d) Vectori non-virali

Transferul genelor cu ajutorul unor vectori non-virali este mai puțin eficient decât transferul cu ajutorul vectorilor virali, deoarece pătrunderea ADN prin intermediul porilor nucleari este redusă. Transferul ADN în nucleu poate fi facilitat prin conjugarea cu secvențe ADN sau proteine specifice (precum secvențe peptidice de localizare nucleară) sau prin compactarea ADN astfel încât să poată pătrunde prin porii nucleari.

Tabelul 20.3. Vectori virali folosiți în terapia genică

Virus	Genom	Capacitate de clonare	Inserția în genomul gazdă	Celule țintă	Expresia transgenei	Avantaje și dezavantaje
Retrovirusuri	ARN	7-8 kb	Da	Numai celule care se divid	De lungă durată	Titru viral moderat[a]; risc de activare a unor oncogene
Lentivirusuri	ARN; ~9 kb	Până la 8 kb	Da	Celule care se divid sau nu; tropism variat	De lungă durată și cu nivel crescut de expresie	Titru viral crescut[a]; risc de activare a unor oncogene
Adenovirusuri	ADN; până la 38 kb	Între 7,5 și 35 kb	Nu	Celule care se divid sau nu	Tranzitorie, dar cu nivel crescut de expresie	Titru viral crescut[a]; efect imunogen puternic
Virusuri adenoasociate	ADN; ~5kb	<4,5 kb	Nu	Celule care se divid sau nu	Nivel crescut de expresie pe durata a câțiva ani	Titru viral crescut[a]; capacitate de clonare redusă; efect imunogen mai slab decât la adenovirusuri
Herpes simplex	ADN; 120-200 kb	>30 kb	Nu	Sistemul nervos central	De lungă durată	Capacitate de a stabili infecții latente pe durata întregii vieți
Vaccinia	ADN; 130-280 kb	25 kb	Nu	Celule care se divid sau nu	Tranzitorie	Tratamentul cancerului

[a] titru viral crescut – 10^{12} unități de transducție/ml; titru viral moderat – 10^{10} unități de transducție/ml

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITARĂ LIBRARY

În plus, expresia genelor transferate este în general mai redusă, deoarece ele nu se integrează în genomul celulelor gazdă.

- **Injectarea directă sau bombardarea unor particule metalice** acoperite cu ADN sunt metode care pot fi folosite în cazul unor țesuturi precum mușchii. Ratele de transfer sunt însă în general reduse, iar expresia genică este de regulă slabă.
- **Lipozomii** sunt vezicule sintetice care se formează spontan atunci când anumite lipide sunt amestecate cu soluții apoase. De exemplu, fosfolipidele pot forma vezicule cu strat dublu ce mimează structura membranelor biologice. Lipozomii cationici au fost folosiți în mod frecvent în protocoalele de terapie genică. Lipozomii protejează ADN în mediul extracelular și pătrund în interiorul celulelor prin endocitoză. Spre deosebire de vectorii virali, lipozomii sunt ușor de preparat și nu există restricții în ceea ce privește dimensiunea ADN transferat. Cu toate acestea eficiența transferului ADN este redusă, iar expresia transgenelor este cel mai adesea limitată în timp.
- **Nanoparticulele ADN compactate** sunt complexe formate între ADN și PEG-CK30 (polietilen glicol legat covalent cu un lanț de 30 reziduuri de lizină și un reziduu de cisteină N-terminal). ADN este un polianion datorită grupărilor sale fosfat și, prin legarea la policationul PEG-CK30 structura sa devine foarte compactată. Ca urmare, nanoparticulele ADN sunt mult mai eficiente în transferul genelor (lungimi de cel puțin 20 kb) în interiorul celulelor.

6.2. Terapia genică de blocare

Tratamentul bolilor produse prin mutații cu câștig de funcție sau mutații cu efect dominant negativ nu poate fi obținut prin transferul în interiorul celulelor a unor gene normale. În schimb, în asemenea boli (adeseori boli cu transmitere dominantă) este necesară blocarea specifică a expresiei genei mutante, fie la nivel de transcripție, fie la nivel de proteină. Metodele folosite pentru inhibarea expresiei la nivel de proteină au fost discutate mai sus (subcapitolul A.3). Blocarea expresiei la nivel de transcripție poate fi realizată cu ajutorul unor oligonucleotide ADN antisens sau molecule ARN terapeutice.

a) Oligonucleotidele antisens (OA)

Terapia cu OA tip ARN, desemnate să se lege pe bază de complementaritate și să inhibe selectiv ARN țintă, a fost folosită în numeroase trialuri clinice, însă rezultatele au fost adeseori dezamăgitoare. Principala problemă este sensibilitatea crescută a ARN la degradare de către nucleaze. Ca urmare, au fost introduse OA tip ADN, care sunt mult mai stabile[5]. OA de generația a doua sunt mult mai stabile chimic datorită utilizării unor analogi de acizi nucleici, precum 2-O-metil fosforotionat, morfolino fosforotionat și acizi nucleici blocați. Deși OA de generația a doua sunt mai stabile chimic, numărul aplicațiilor clinice este încă redus datorită dificultății transferului acestora în interiorul celulelor și datorită apariției uneori a unor efecte nespecifice (țintirea mai multor specii de ARN). Pentru creșterea eficienței transferului în celule a OA de generația a doua pot fi conjugate cu o serie de secvențe peptidice. Din păcate, uneori acestea conduc la apariția unor reacții imunologice.

Pe lângă blocarea expresiei unei gene mutante, OA pot fi folosite pentru restaurarea funcției sale, prin fenomenul de „sărire a unui exon" (*exon skipping*). Mutațiile implicate în asemenea circumstanțe sunt de regulă mutații nonsens sau mutații cu decalarea cadrului de lectură. Pentru obținerea unui asemenea efect, OA se leagă la nivelul joncțiunilor exon-intron ale moleculei de ARNm precursor și induc blocarea matisării la nivelul acelei joncțiuni, cu excluderea următorului exon (purtător al mutației) din structura ARNm matur. Pentru ca această strategie să fie utilă clinic este necesar ca exonul exclus să nu conțină secvențe esențiale pentru funcția proteinei și ca excluderea exonului să nu conducă la apariția unui decalaj al cadrului de lectură.

> Această strategie a fost dezvoltată relative recent pentru tratamentul distrofiei musculare Duchenne. În această boală multe din mutații sunt localizate în interiorul unui exon al genei *DMD* care nu codifică secvențe esențiale ale distrofinei, dar asociază codon stop sau decalarea cadrului de lectură. Metoda a fost folosită cu succes inițial în culturi de celule musculare și apoi la un model de șoarece. În prezent există trialuri clinice în curs de derulare care încearcă să elimine exonul 51 al genei umane, sediul celor mai frecvente mutații ale genei *DMD*.

b) Ribozimele

Ribozimele sunt molecule ARN care au în mod natural activitate enzimatică, clivând alte molecule de ARN. Ele conțin două componente esențiale: secvența de recunoaștere (care se leagă pe bază de complementaritate la molecula ARN-țintă) și componenta catalitică care clivează molecula ARN-țintă legată (figura 20.5). Exemple de ribozime sunt ribonucleaza P umană sau diverse ribozime izolate din viroizi de la plante. Prin inginerie genetică asemenea ribozime pot fi modificate astfel încât să recunoască și să degradeze secvențe ARNm specifice, care conțin o mutație nedorită. În ciuda optimismului inițial, utilizarea

5. În 1998 Vitravene® (fomivirsen) a devenit primul oligonucleotid antisens aprobat de FDA pentru tratamentul retinitei citomegalice la pacienții cu SIDA.

ribozimelor s-a dovedit destul de puțin eficientă în trialurile clinice.

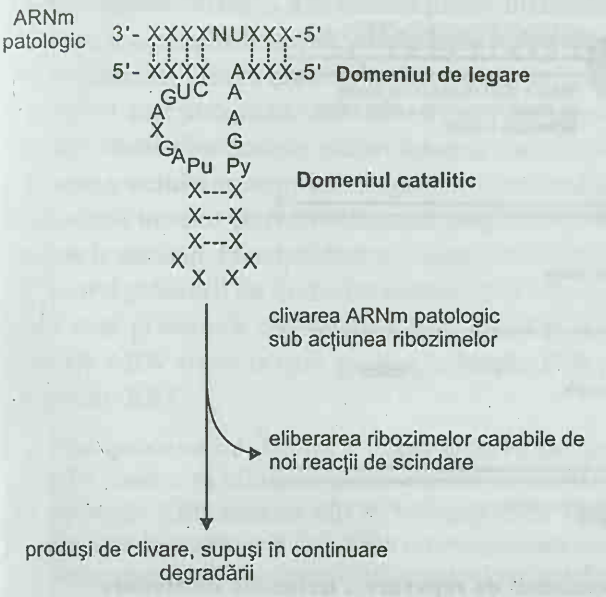


Figura 20.5. Mecanismul de acțiune al ribozimelor

c) ARN interferent (ARNi)

Descoperirea ARNi în anii 1990 a crescut foarte mult potențialul de inhibiție specifică a expresiei genice și a stimulat semnificativ dezvoltarea terapiei ARN. Obiectivul este generarea unor molecule de ARN bicatenar complementare cu o porțiune a genei de interes, inducând astfel activarea unor căi naturale intracelulare ce vor distruge produsul de transcripție al genei-țintă. Așa cum am prezentat în capitolul 5, introducerea în celulele umane a unor molecule de ARN bicatenar lungi nu este benefică întrucât induce producția de interferon și inhibiția nespecifică a expresiei genice. În schimb, moleculele de ARN bicatenare scurte, de 21-23 nucleotide (ARNsi), sunt foarte eficiente în inducerea atenuării expresiei genelor-țintă. În prezent tehnologia ARNsi este testată în numeroase experimente preclinice și trialuri clinice în boli virale infecțioase, în cancere (țintirea oncogenelor) și în boli neurodegenerative. Un exemplu de trial clinic implementat deja cu oarecare succes este tratamentul degenerării maculare cu ajutorul ARNsi împotriva genei *VEGF*.

6.3. *Terapia genică de corecție a genei mutante*

Recombinarea omoloagă, mecanism utilizat pentru repararea leziunilor ADN bicatenare (vezi capitolul 7), poate fi utilizată pentru înlocuirea unei secvențe ADN date cu una asemănătoare. Recombinarea omoloagă a fost utilizată intens pentru inactivarea selectivă a unor gene („*gene knockout*"). În principiu această tehnologie ar putea fi folosită în scop invers, de reparare a unei alele mutante, prin înlocuirea acesteia cu alela normală. În realitate însă această metodă nu are aplicabilitate practică deoarece rata recombinării omoloage în celulele umane este extrem de redusă (circa un eveniment în 10^6 celule).

Obținerea recentă prin inginerie genetică a unei clase noi de nucleaze a transformat însă complet această realitate. Este vorba despre *nucleazele cu „degete de zinc"* care sunt de fapt niște enzime de restricție fuzionate cu domenii proteice cu structură în degete de zinc (vezi capitolul 4) care sunt capabile să recunoască secvențe ADN specifice lungi. Fiecare nuclează conține un domeniu cu capacitate de clivare a ADN derivat din enzima de restricție *FokI*[6], alături de patru degete de zinc care recunosc fiecare câte un triplet de nucleotide. Prin folosirea a două nucleaze cu degete de zinc ce recunosc fiecare câte 12 nucleotide învecinate, dar nu suprapuse, se poate obține o ruptură ADN bicatenară (figura 20.6). Apariția unei rupturi bicatenare declanșează apoi mecanismele celulare de reparare ale acestora.

Așa cum am prezentat în capitolul 7, unul dintre mecanismele cele mai folosite de reparare a leziunilor ADN bicatenare este recombinarea omoloagă. Odată activată, frecvența sa crește de 100 până la 10,000 ori. Mecanismul de reparare prin recombinarea omoloagă constă mai întâi într-un proces de degradare nucleolitică a capetelor rupte, urmat de resinteza ADN pe baza unei matrițe de ADN omolog. Dacă alela care este reparată este cea care conține mutația patogenică, repararea poate fi făcută folosind ca matriță alela normală. Eficiența reparării corecte este însă crescută dacă în celule este introdus de asemenea un plasmid care conține secvența corectă.

Utilitatea acestei metode a fost demonstrată prin corectarea unor mutații patogenice producătoare de boală în culturi de celule (un exemplu este acela al mutației patogenice a genei *IL2RG* implicată în producerea imunodeficienței combinate severe legată de cromozomul X, boală care va fi discutată în subcapitolul următor). Nucleazele cu degete de zinc pot fi utilizate de asemenea pentru inactivarea unor gene. Un exemplu este generarea de limfocite T helper CD4+ rezistente la infecția cu virusul HIV-1 prin inactivarea genei *CCR5*. Gena CCR5 codifică un receptor pentru chemokine exprimat în mod normal pe suprafața acestor celule, dar care mediază de asemenea infecția lor cu virusul HIV-1. Unii indivizi care sunt în mod natural rezistenți la infecția cu HIV-1 sunt homozigoți pentru o deleție de 32 pb care conduce la inactivarea acestui receptor.

6. *FokI* are capacitatea de a induce doar rupturi monocatenare.

BCU IAȘI - BIBLIOTECA UNIVERSITARĂ

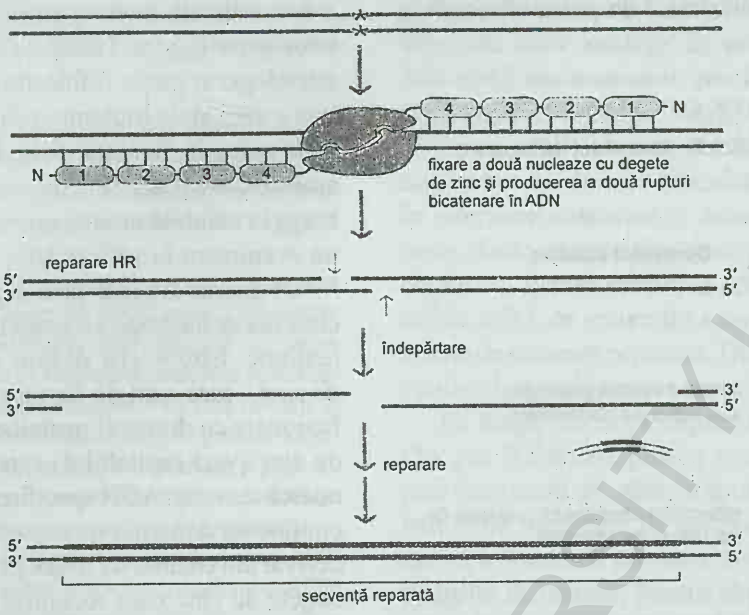


Figura 20.6. Corecția unei gene mutante prin mecanismul de reparare a leziunilor bicatenare ale ADN folosind nucleaze cu degete de zinc

6.4. Terapia genică în practica medicală

Până în anul 2009 au fost aprobate circa 1.500 de protocoale de terapie genică. Având însă în vedere complexitatea etapelor ce trebuiesc parcurse în implementarea în practica clinică a oricărei metode noi de tratament, doar 3% din aceste 1.500 trialuri sunt trialuri clinice de faza a III-a, fază în care se testează pe scară largă eficacitatea tratamentului. Aproape două treimi din toate trialurile de terapie genică aprobate se adresează cancerului în timp ce bolile monogenice, bolile infecțioase și bolile cardiovasculare întrunesc fiecare circa 10% din aceste trialuri.

a) Terapia genică în cancer

Cancerul este în prezent domeniul cel mai intens de aplicare a metodelor de terapie genică datorită progresele cunoașterii în oncogenetică, letalitatea, severitatea bolilor neoplazice, prognosticul nefavorabil și resursele financiare care se alocă în această direcție. Există numeroase procedee de terapie genică în cancer, unele dintre acestea aducând deja rezultate promițătoare în ceea ce privește limitarea extensiei locale a bolii, precum și a metastazelor.

- Uciderea țintită a celulelor canceroase prin inserția unor virusuri oncolitice modificate genetic, ori a unor gene care codifică toxine (precum toxina difterică), proteine implicate în declanșarea apoptozei sau proteine care conferă sensibilitate la acțiunea unor medicamente (precum gena pentru timidin kinază de la *Herpes simplex*, care induce sensibilitate la acțiunea ganciclovirului).
- Stimularea activității de distrugere a celulelor canceroase de către celulele NK prin creșterea antigenicității celulelor tumorale (de exemplu prin inserția în celulele tumorale a unor gene care codifică antigene străine) sau creșterea activității celulelor sistemului imun prin inserarea la nivelul lor a unor gene care codifică citokine (precum inserarea IL2 și IL4 în celulele dendritice pentru creșterea capacității lor de a distruge celulele tumorale în cazul melanomul malign).
- Protejarea țesuturilor normale împotriva efectelor chimio/radioterapiei (prin inserția la nivelul acestora a unor gene de rezistență (de exemplu gena *MDR1 – multiple drug resistance type* 1).
- Inactivarea oncogenelor prin inhibarea selectivă a transcripției acestora (de exemplu, a genei *KRAS* în cancerele pulmonare) sau prin utilizarea unor oligonucleotide antisens sau a unor ribozime care se leagă și clivează ARNm codificat de oncogenă.
- Inserția unor gene supresoare a creșterii tumorale, precum inserarea variantei normale a genei supresoare de tumori în celulele tumorale (precum gena TP53 în cancerele ovariene).

O problemă generală pentru toate aceste metode de terapie este faptul că ele nu sunt 100% eficiente. Ca urmare, deși multe dintre aceste metode conduc la reducerea tumorilor, acestea vor crește din nou, conducând la recidiva bolii. De aceea, ideea vindecării cancerului este înlocuită cu ideea mai realistă de management de lungă durată a bolii canceroase.

b) Terapia genică în bolile infecțioase

Metodele utilizate în terapia genică a bolilor infecțioase sunt în parte diferite față de cele utilizate pentru

BCU "IULIU HAȚIEGANU" UNIVERSITY LIBRARY

tratamentul cancerului. Unele metode au ca obiectiv intensificarea răspunsului imun al organismului împotriva celulelor infectate. Alte metode țintesc însă ciclul de viață al agentului infecțios, reducându-i capacitatea de proliferare. Dintre toate infecțiile virale, infecția cu HIV-1 este ținta celor mai multe trialuri de terapie genică. Multe dintre aceste trialuri folosesc transfecția *ex vivo* a celulelor stem hematopoietice cu vectori retrovirali urmată de reintroducerea celulelor astfel tratate la pacienți. Principalele ținte terapeutice folosite în scopul generării de limfocite rezistente la infecția HIV sunt proteinele reglatoare TAT și REV și secvențele ARN virale la care acestea se leagă: TAR și respectiv RRE.

Principalele metode folosite în terapia genică a infecției HIV constau în utilizarea de:

- molecule ARN antisens față de secvența ARN TAR, sau față de moleculele de ARNm *tat*, *rev*, *pol* sau *env*;
- doze crescute ale secvenței RRE în scopul sechestrării în întregime a proteinei rev și a prevenirii în acest fel a replicării virale;
- gene care codifică proteine rev mutante cu efect dominant negativ, precum proteina RevM10. Aceasta se leagă la secvența RRE, dar împiedică formarea complexului multiproteic necesar pentru exportul RNA în afara nucleului celulelor infectate;
- ribozime direcționate împotriva regiunii reglatorii *tat* (precum ribozima RRz2);
- anticorpi intracelulari (intracorpi) direcționați împotriva proteinelor reglatorii tat sau rev, ori a glicoproteinei gp160 din structura învelișului viral;
- nucleaze cu degete de zinc desemnate să inactiveze gena *CCR5* care mediază pătrunderea HIV în limfocitele T helper CD4+ (vezi mai sus).

O parte dintre aceste metode a permis inducerea unui nivel crescut de rezistență față de HIV de până la 1-2 ani.

c) Terapia genică în bolile cardio-vasculare

În ultimii 20 de ani s-au înregistrat progrese considerabile în descifrarea mecanismelor moleculare ale bolilor cardiovasculare (procesele ce duc la ateroscleroză și ocluzie vasculară, disfuncția celulelor endoteliale ș.a.). Aceste progrese au deschis perspectivele aplicării terapiei genice și în câțiva ani s-au obținut rezultate promițătoare în:

- stimularea angiogenezei în bolile ischemice (folosind ADNc pentru factorul de creștere endotelială vasculară – VEGF sau factorul de creștere fibroblastică – FGF);
- prevenirea restenozării după angioplastie transluminală, prin blocarea proliferării celulare folosind oligonucleotide antisens față de ARNm al unor CDK-cicline sau factori de creștere;
- tratamentul arteriopatiei membrelor inferioare (cu ADNc pentru VEGF).

În momentul de față, cea mai eficientă terapie este cea regenerativă. Regenerarea cardiomiocitară post-infarct miocardic se realizează prin injectare directă intramiocardică și livrare directă a celulelor stem în circulația coronară. În fază experimentală se află antagomir-21, un oligonucleotid ARN sintetic, care inhibă activitatea ARNmi-21. ARNmi-21 atinge nivele crescute în fibroblastele cardiace ale pacienților cu insuficiență cardiacă. Studiul ARNmi-21 la șoareci cu insuficiență cardiacă au arătat că nivelele crescute ale ARNmi-21 cresc activitatea kinazelor ERK-MAPK[7] și produc fibroză interstițială, remodelare și disfuncție cardiacă. Antagomir-21 ține moleculele ARNmi-21 și inhibă activitatea acestora, demonstrând efect terapeutic în insuficiența cardiacă. Desigur, sunt încă multe dificultăți de depășit (mai ales în găsirea unor vectori eficienți), dar acest domeniu rămâne foarte actual în cercetările din terapia cardio-vasculară.

6.5. Considerații etice privind terapia genică

La fel ca în cazul a numeroase alte forme noi de tratament, trialurile de terapie genică au fost subiectul unei atenții deosebite a comitetelor de reglare a problemelor etice. Cu toate acestea, majoritatea agențiilor guvernamentale și religioase care au examinat propunerile pentru terapia genică a unor boli genetice umane au fost de acord că această oportunitate terapeutică să fie studiată și aplicată. Spre deosebire de terapia genică germinală prin care persoanele tratate nu s-au născut încă și nu pot face singure o opțiune, terapia genică somatică ridică puține probleme de ordin etic care nu sunt întâlnite de rutina în cazul evaluării altor noi metode de tratament (de exemplu, implementarea unui nou medicament citostatic presupune testarea pe voluntari – este etic să aplici un tratament unor persoane fără speranță atunci când nu se cunoaște efectul pe termen lung?).

7. ERK – *extracellular signal-regulated kinase*; MAPK – *mitogen-activated protein kinase.*

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B. Terapia bolilor monogenice

Ideea instituirii unor metode de tratament pentru bolile monogenice, considerate altădată boli fatale, a fost pentru prima dată discutată ca o problemă prioritară în cadrul celui de-al 3-lea Congres Internațional de Genetică Umană de la Chicago, 1966, când una dintre secțiuni a fost intitulată: „Tratamentul în Genetica Medicală". Încă de atunci această problemă a fost abordată cu mult optimism, dar rezultatele ulterioare s-au dovedit modeste.

Cu un deceniu mai înainte se inițiase deja utilizarea tratamentului dietetic în fenilcetonurie, care a permis prevenirea retardului mental asociat acestei boli. Icterul neonatal determinat de incompatibilitatea materno-fetală în sistemul Rh, putea fi, de asemenea, prevenit. A fost propus chiar un algoritm simplu de tratament pentru bolile produse prin erori de metabolism în care măsurile de bază erau restricția substratului toxic, înlocuirea produsului final deficitar, suplimentarea unor coenzime (care să stimuleze activitatea limitată a enzimelor mutante), ori înlocuirea proteinei – enzimei deficitare. Chiar și ideea „ingineriei genetice" era percepută ca o modalitate posibilă, cu cert potențial curativ. Cu toate acestea, un studiu publicat în 1985 estima că metodele de tratament folosite la acea dată îmbunătățiseră capacitatea reproductivă în doar circa 11% din bolile mendeliene, capacitatea de adaptare socială în 6% din aceste boli, iar durata de viață era normalizată doar în circa 15% dintre bolile asociate cu moarte prematură. Un alt studiu publicat în 1995, adresat unui număr de 65 de boli mendeliene arata că tratamentul la acea dată era considerat complet eficient în 12% din cazuri, parțial eficient în 57% din cazuri și fără nici un beneficiu în 31% din cazuri.

Există două cauze majore ale acestor rezultate modeste. În primul rând, în multe dintre bolile monogenice, locusul mutant nu este încă cunoscut, iar pentru multe din bolile ale căror mutații au fost cartografiate înțelegerea patogeniei bolii este doar parțială.

De exemplu, chiar și în cazul fenilcetonuriei, una dintre primele boli genetice studiate, mecanismul prin care hiper-fenilalaninemia conduce la alterarea dezvoltării cerebrale este insuficient înțeles. În al doilea rând, multe dintre mutații acționează precoce în cursul dezvoltării sau determină tulburări ireversibile înainte de punerea diagnosticului. Această problemă poate fi anticipată în unele cazuri dacă există un istoric familial de boală genetică, iar *screening*-ul purtătorilor identifică cupluri cu risc. În asemenea circumstanțe o posibilitate este utilizarea tratamentului prenatal, fie medical, fie chirurgical, utilizabil în prezent pentru unele boli. Exemple sunt administrarea la mamă de cobalamină în cazul aciduriei metilmalonice ce răspunde la cobalamină sau vezicostomia ori cateterizarea percutanată în cazul hidronefrozei determinate de existența unei valve uretrale.

Înainte de a prezenta principalele strategii utilizate în tratamentul bolilor monogenice vom sublinia că dezvoltarea unor noi metode de tratament pentru această categorie de boli este îngreunată de doi factori: necesitatea unei studieri îndelungate a tratamentului înainte de standardizarea sa, pe de o parte, și heterogenitatea genetică, pe de altă parte.

(1) Există mai multe cauze care fac necesară o analiză îndelungată a fiecărei noi modalități de tratament.

- În primul rând modalități de tratament care par a avea la început succes deplin pot releva pe parcurs unele deficiențe. De exemplu, deși tratamentul dietetic în fenilcetonurie permite evitarea retardului mental sever, persistă adeseori unele deficite în procesele de învățare și unele tulburări de comportament.
- În al doilea rând, prelungirea duratei de viață a pacienților, ca urmare a aplicării unor metode de tratament, poate să evidențieze noi manifestări clinice ale bolii, care nu erau evidente în cazul unei evoluții naturale. Un exemplu este retinoblastomul familial, boala altădată fatală în primii ani de viață ca urmare a dezvoltării unor tumori oculare maligne. Pacienții tratați cu succes (enucleerea globului ocular) au un risc crescut de apariție a unor tumori independente, osteosarcoamele, care devin evidente clinic după prima decadă de viață.
- În sfârșit, unele metode de tratament foarte eficace pe termen scurt pot să evidențieze în timp efecte secundare importante. Exemple sunt dezvoltarea anticorpilor în cazul tratamentelor de înlocuire a proteinelor mutante sau riscul mutagenezei inserționale în cazul unor metode de terapie genică.

(2) Așa cum am discutat în capitolul 6 bolile genetice sunt caracterizate adeseori de fenomenul de heterogenitate genetică (alelică sau de locus). Tratamentul corect al bolilor genetice impune adeseori adaptarea sa la nivelul moleculei afectate. De exemplu, hiperfenilalaninemia rezultă atât prin anomalii ale fenilalanin hidoxilazei, cât și prin deficitul enzimelor care intervin în metabolismul biopterinei (vezi capitolul 12), dar tratamentul la nivel molecular al acestor afecțiuni este însă diferit. Uneori, chiar și mutațiile diferite ale aceleiași gene pot necesita tratament diferit. Exemple sunt talasemia și sicklemia, ambele fiind boli determinate de mutații ale genei pentru beta-globină. Mutațiile aceleiași gene pot determina nu numai boli diferite, dar, mult mai frecvent, grade diferite de severitate

ale aceleiaşi boli, fapt care impune necesitatea unui grad suplimentar de „personalizare" a terapiei. În sfârşit, tratamentul trebuie să ţină seama de consecinţele mutaţiei asupra proteinei codificate: mutaţii cu pierderea sau câştigul funcţiei, mutaţii cu efect dominant negativ etc. (vezi capitolul 12).

Modalităţile de tratament ale diferitelor boli monogenice utilizate în prezent depind în mare măsură de nivelul cunoştinţelor disponibile privitoare la bazele moleculare şi patogenia acestor boli. În general, bolile moleculare beneficiază, cel puţin la nivel de posibilităţi teoretice, de mai multe strategii de abordare a tratamentului, în timp ce bolile cu substrat genetic necunoscut sunt adeseori tratate simptomatic. Ca urmare, dacă privim boala ca un model biologic, putem deosebi:

- strategii care acţionează asupra fenotipului clinic (tratamentul simptomatic);
- metode de tratament care vizează corectarea tulburărilor metabolice sau ale altor defecte biochimice asociate;
- metode de tratament care acţionează la nivelul proteinei mutante;
- transplantele de organ;
- metode de modulare a expresiei genice;
- terapia genică.

1. Metode de tratament care acţionează la nivelul fenotipului

Tratamentul simptomatic este, chiar şi în prezent, strategia principală la care se recurge într-o multitudine de boli monogenice. În această categorie sunt incluse metode educaţionale pentru prevenirea unor factori declanşatori ai manifestărilor clinice, precum şi metode farmacologice sau chirurgicale de tratament. Defectul genetic de bază nu este modificat, însă manifestările clinice sunt adeseori ameliorate semnificativ. Exemple de metode de prevenţie sunt *educarea pacienţilor* cu anumite boli, obiectivul fiind acela al evitării expunerii la factorii de mediu şi la medicamentele care declanşează apariţia simptomelor sau limitarea expunerii la radiaţiile ultraviolete a pacienţilor cu albinism ori xeroderma pigmentosum. Printre exemplele de *procedee farmacologice* pot fi menţionate administrarea de agenţi blocanţi beta-adrenergici la pacienţii cu sindrom Marfan în vederea evitării dilatării rădăcinii aortice şi a dezvoltării disecţiei de aortă. În sfârşit, *intervenţiile chirurgicale* sunt metode eficiente în corecţia condrodistrofiilor, sau la pacienţii cu risc crescut de dezvoltare a unor neoplazii la nivelul unui anumit organ (precum tiroidectomia profilactică la copiii cu *MEN2b*).

2. Tratamentul tulburărilor metabolice sau biochimice asociate bolilor monogenice

Tratamentul la acest nivel se realizează prin metode farmacologice sau nutriţionale şi depinde în mare măsură de înţelegerea patogeniei bolii. Aşa cum aminteam în capitolul 12, modalităţile prin care o enzimă mutantă poate determina fenotipul bolii sunt: *acumularea* substratului la niveluri toxice, producerea în *exces* a unui metabolit alternativ, *deficienţa* produsului de reacţie sau diverse combinaţii ale acestora. Deşi această paradigmă este cel mai uşor vizibilă în cazul bolilor produse prin deficite enzimatice, ea este valabilă în cazul tuturor produşilor genici care participă în interacţiuni biochimice sau moleculare dinamice. Ca urmare a proceselor fiziopatologice amintite, se pot utiliza următoarele modalităţi de tratament: restricţia substratului, utilizarea unor căi metabolice alternative pentru îndepărtarea metaboliţilor toxici, utilizarea unor inhibitori metabolici sau înlocuirea produsului de reacţie deficitar (tabelul 20.4).

2.1. Restricţia dietetică a substratului

Reducerea aportului alimentar al unui anumit substrat poate fi eficientă în bolile în care fenotipul este consecinţa dominantă a efectului toxic indus de acumularea

Tabelul 20.4. Modalităţi de tratament ale bolilor monogenice prin manipulare metabolică

Tipul de intervenţie	Substanţa sau tehnica utilizată	Boala
Restricţia dietetică	Fenilalanina Galactoza	Fenilcetonuria Galactozemia
Utilizarea unor căi metabolice alternative	Benzoatul de sodiu Penicilamina	Tulburări ale ciclului ureei Boala Wilson
Inhibiţia metabolică	Allopurinolul Statinele	Guta Hipercolesterolemia familială
Înlocuirea produsului deficitar	Tiroxina Biotina	Hipotiroidismul congenital Deficienţa de biotinidază

sa în organism. În prezent sunt tratate în acest fel boli determinate prin mutații la nivelul a peste 24 loci. Dietele restrictive în fenilalanină sau aminoacizi ramificați începute precoce după naștere sunt eficiente în prevenirea retardului mental asociat *fenilcetonuriei*, respectiv *bolii urinii cu miros de sirop de arțar*. La fel, reducerea aportului alimentar de galactoză corectează deficitul de creștere, previne cataracta și reduce, dar numai parțial, deficitele cognitive în *galactozemie*. Cu toate acestea, insuficiența ovariană la femeile cu galactozemie care au fost tratate precoce persistă ca o complicație tardivă a bolii. Nivelul restricției substratului poate fi adaptat gradului de deficit al activității enzimatice, formele moderate sau ușoare de boală beneficiind de o restricție moderată.

2.2. Utilizarea unor căi alternative de îndepărtare a metaboliților toxici

Pentru acele boli în care fenotipul clinic este consecința acumulării unor metaboliți toxici, pot fi utilizate *modalități de conversie* ale acestora în produși mai puțin toxici, care pot fi eliminați mai ușor din organism. Eficacitatea unor asemenea procedee este însă adeseori limitată de capacitatea sistemului de conversie și necesită combinarea cu procedeele de restricție ale substratului. Administrarea de benzoat de sodiu la pacienții cu *tulburări ale ciclului ureei* ilustrează această modalitate de tratament. Benzoatul de sodiu suferă reacții de conjugare cu glicina, formând hipuratul, produs care este eliminat mai ușor prin urină și care conține o cantitate mai mare de azot decât precursorii săi, realizând astfel o modalitate eficientă de eliminare a excesului de amoniu, caracteristică acestor boli. Adeseori este însă asociată și restricția aportului alimentar de proteine. Modalități similare sunt: utilizarea glicinei pentru conjugarea cu izovaleril-CoA în acidemia izovalerică, folosirea cisteaminei pentru a ușura eliminarea cistinei în cistinoză sau a penicilaminei pentru eliminarea excesului de cupru în boala Wilson.

2.3. Utilizarea inhibitorilor metabolici

În anumite boli, cum sunt cele în care simptomatologia clinică este rezultatul acumulării toxice a produșilor de reacție ai unor căi metabolice alternative, o modalitate eficientă de tratament este utilizarea unor *inhibitori specifici* pentru acele căi metabolice. O consecință o reprezintă acumularea substratului din amonte, dar acesta poate fi uneori mai bine tolerat. De exemplu, allopurinolul este utilizat ca inhibitor al xantin oxidazei în *gută* și în alte boli caracterizate prin degradarea excesivă a purinei și acumularea acidului uric. Inhibiția xantin oxidazei conduce la reducerea nivelelor sangvine ale acidului uric, și, ca urmare, scade posibilitatea apariției nefropatiei urice și a artritei din cadrul gutei. O consecință a acestui tratament este însă acumularea xantinei, dar aceasta este mai bine tolerată de către organism deoarece este mai solubilă. În *hipercolesterolemia familială,* heterozigoții pentru mutațiile receptorului LDL (vezi capitolul 12) tratați cu inhibitori de tip statină ai HMG-CoA reductazei[8] vor beneficia de o reducere semnificativă a nivelului plasmatic al colesterolului. În sfârșit, un alt exemplu de utilizare foarte eficientă a terapiei cu un inhibitor enzimatic este îmbunătățirea evidentă a prognosticului pacienților cu *tirozinemie ereditară de tip I* prin utilizarea NTBC[9], un inhibitor al 4-hidroxifenilpiruvat dioxigenazei.

2.4. Înlocuirea produsului deficitar

Înlocuirea unui produs de reacție deficitar este una dintre modalitățile cele mai eficiente de tratament al unor boli monogenice. Un exemplu semnificativ este cel al *hipotiroidiei congenitale*, afecțiune cu determinism monogenic în 10-15% din cazuri. Această boală rezultă prin diverse defecte în dezvoltarea glandei tiroide sau în sinteza principalului său hormon, tiroxina. Deoarece hipotiroidia congenitală este o boală foarte frecventă (1 la circa 4.000 nou-născuți), iar administrarea de tiroxină poate preveni instalarea retardului mental, *screening*-ul neonatal este practicat extensiv în numeroase țări (vezi capitolul 19) pentru ca terapia să poată fi inițiată cât mai precoce după naștere. La fel, administrarea de biotină la pacienții cu *deficit de biotinidază* permite restabilirea activității carboxilazelor biotin-dependente și prevenirea apariției manifestărilor clinice. În sfârșit, administrarea de uridină la pacienții cu deficit de sinteză a pirimidinei ca urmare a *aciduriei orotice ereditare* permite corectarea anemiei macrocitare determinate de deficitul de pirimidină.

3. Metode de tratament care acționează la nivelul proteinei deficitare

Tratamentul la acest nivel presupune fie *restabilirea activității* unei proteine mutante (prin stimularea activității reziduale sau prin creșterea stabilității sale),

8. 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductaza este enzima care catalizează etapa cheie precoce în sinteza colesterolului.
9. 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1,3-ciclohexandiona.

fie *înlocuirea* proteinei defective cu varianta normală (în cazul mutațiilor care abolesc complet funcția proteinei) – vezi tabelul 20.5.

3.1. Stimularea funcției proteinei mutante

Intensificarea activității unei enzime disfuncționale poate fi realizată prin administrarea în doze farmacologice a unor vitamine, atunci când acestea sunt cofactori ai acelei proteine. De fapt, bolile monogenice ce răspund la administrarea unor vitamine sunt afecțiuni care pot fi tratate cu cel mai mare succes. Aceasta pentru că organismul tolerează adeseori administrarea unor cantități de până la 100-500 de ori mari decât necesarul pentru nutriția normală.

Mecanismul responsabil pentru beneficiul terapeutic variază de la boală la boală. De exemplu, *homocistinuria* este rezultatul unor mutații ale cistationin-sintetazei care reduc afinitatea acestei proteine pentru cofactorul său – piridoxal fosfatul. Aproximativ 50% dintre acești pacienți redobândesc o activitate semnificativă a enzimei prin administrarea unor doze crescute de vitamina B6 – precursorul piridoxal fosfatului (50-500 mg piridoxină/zi). Creșterea activității hepatice a enzimei este relativ mică – de la 1,5% la 4,5% din activitatea normală –, dar chiar și o astfel de creștere poate îmbunătăți dramatic evoluția clinică a bolii și determină dispariția homocistinei din plasmă. În cazul *deficitului de biotinidază* (vezi mai sus) mutațiile acestei enzime au ca rezultat limitarea capacității de reciclare a biotinei din proteinele biotinilate. Administrarea orală a unor cantități crescute de biotină permite compensarea deficitului enzimatic și prevenirea dezvoltării sechelelor neurologice.

3.2. Înlocuirea proteinei mutante

Înlocuirea proteinei mutante cu varianta proteică normală continuă să fie un domeniu de interes major în tratamentul bolilor monogenice, dar în prezent este utilizată cu succes în mai puțin de 1% dintre bolile genetice pentru care există o formă de tratament.

Pentru ca această formă de terapie să aibă succes, proteina normală trebuie să fie capabilă să ajungă la nivelul compartimentului funcțional. Acest obiectiv este ușor de realizat atunci spațiul țintă îl constituie compartimentul extracelular, precum tractusul gastrointestinal (de exemplu, tratamentul insuficienței pancreatice asociate *fibrozei chistice*), plasma (de exemplu, tratamentul *hemofiliilor*) sau spațiul extracelular (precum tratamentul *deficienței alfa1-antitripsinei* – vezi mai jos).

Alfa1-antitripsina (α1-AT) este inhibitorul major al elastazei produsă de către neutrofile (vezi și capitolul 7.D).

Tabelul 20.5. Modalități de tratament care acționează la nivelul proteinei mutante

Strategia terapeutică	Exemple	Statusul tratamentului
Stimularea funcției proteinei mutante Administrarea unor cofactori pentru a crește activitatea enzimatică	Homocistinuria ce răspunde la piridoxină	Tratamentul de elecție pentru circa 50% dintre pacienți
Înlocuirea proteinei mutante Înlocuirea unei proteine extracelulare	• Factorul VIII în hemofilia A • α1-AT în deficiența α1-AT	Eficient Administrarea intravenoasă sau sub formă de aerosoli pentru a crește nivelul activității în interstițiul pulmonar.
Înlocuirea extracelulară a unei proteine intracelulare Țintirea intracelulară a unei proteine	• PEG-ADA în deficiența ADA • Glucocerebrozidaza modificată (Cerezyme) în boala Gaucher • α-Galactozidaza A (Fabrazyme) în boala Fabry • α-Glucozidaza (Myozyme) în boala Pompe • Iduronat-2-sulfataza (Elaprase) în sindromul Hunter • Arilsulfataza B (Naglazyme) în sindromul Maroteaux-Lamy • α-L-iduronidaza (Aldurazyme) în sindroamele Hurler și Hurler-Scheie	Bine standardizat, sigur și eficient, dar costisitor Standardizat, eficient clinic și biochimic, dar costisitor

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Indivizii homozigoți pentru varianta Z (circa 40.000 numai în America de Nord) au o activitate enzimatică redusă sub 15% și un risc crescut de dezvoltare a insuficienței pulmonare precoce. Cea mai eficientă modalitate de prevenire a instalării manifestărilor clinice ale deficienței alfa 1-antitripsinei este evitarea fumatului. În prezent este însă posibilă administrarea intravenoasă de α1-AT în doze suficient de mari pentru a menține un nivel eficient al activității enzimatice în interstițiul pulmonar pentru cel puțin o săptămână. Această modalitate de tratament este eficientă clinic numai la pacienții care au o afectare pulmonară moderată (funcție pulmonară restantă între 30 și 65%). α1-AT poate fi administrată, de asemenea, inhalator, iar această modalitate permite atingerea unor nivele eficiente atât în plasmă, cât și în interstițiul pulmonar prin utilizarea a două doze zilnice.

În cazul deficiențelor unor proteine intracelulare a fost necesară dezvoltarea unor modalități direcționate (țintite) de administrare către compartimentul intracelular corespunzător. Fezabilitatea acestui obiectiv a fost demonstrată pentru bolile de stocaj lizozomale (vezi capitolul 12), precum *boala Gaucher*, *sindromul Hunter*, *boala Hurler* sau *boala Pompe*.

În boala Gaucher pacienții sunt tratați prin administrarea de glucocerebrozidază. Pentru a rezolva problema orientării acestei proteine către lizozomii macrofagelor a fost necesară îndepărtarea unor resturi de carbohidrați de la nivelul capătului carboxiterminal al proteinei, ceea ce permite expunerea unui miez de α-manozil. Manoza expusă este recunoscută prin intermediul unui receptor pentru manoză existent pe suprafața macrofagelor și astfel proteina este internalizată și eliberată către lizozomi.

Terapia de substituție ridică două probleme majore: stabilitatea proteinei administrate și capacitatea acesteia de a determina formarea de anticorpi neutralizanți, care pot anula eficacitatea tratamentului. O modalitate inovativă care încearcă să rezolve aceste probleme a fost dezvoltată în cadrul tratamentului *deficienței adenozin dezaminazei*.

Adenozin dezaminaza (ADA) este o enzimă critică în cadrul metabolismului purinic care catalizează dezaminarea adenozinei către inozină și a dezoxiadenozinei către dezoxiinozină. Deficiența ADA este o boală autozomal recesivă caracterizată prin insuficiența activității atât a imunității celulare (limfocitele T), cât și a celei umorale (limfocitele B) – imunodeficiența combinată severă (SCID). Pacienții netratați decedează ca urmare a unor infecții severe în primii doi ani de viață. Transplantul de măduvă de la un donor compatibil HLA este în prezent modalitatea standard de tratament. În cazul pacienților pentru care nu există un donor corespunzător a fost însă dezvoltată o modalitate de tratament bazată pe administrarea de ADA bovină modificată. Pentru a evita problemele legate de stabilitatea proteinei și imunogenicitatea sa, ADA a fost atașată covalent la un polimer inert – polietilen glicolul (PEG). PEG-ADA administrată sub forma de injecții intramusculare săptămânale nu pătrunde în celule, are imunogenicitate redusă[10] și un timp de înjumătățire plasmatică de 3-6 zile. Chiar dacă proteina nu pătrunde la nivel intracelular, ea este capabilă să își exercite activitatea în plasmă și corectează aproape complet anomaliile metabolice, ceea ce determină o îmbunătățire spectaculoasă a tabloului clinic.

Alte probleme considerate în cadrul terapiilor de înlocuire ale proteinelor mutante includ costul procurării unor cantități suficiente pentru a trata toți pacienții prin administrări conform timpului lor de înjumătățire (de exemplu 8-10 ore pentru factorul VIII al coagulării) sau contaminarea proteinei cu agenți străini, în particular cu virusuri (precum virusurile hepatitice sau HIV). Introducerea tehnologiei ADN recombinant (vezi subcapitolul A.2 și A.3) promite eliminarea celor mai multe dintre aceste probleme.

4. Metode de tratament bazate pe modularea farmacologică a expresiei genice

Așa cum am amintit în cazul mutațiilor cistationin-sintetazei care sunt responsabile de producerea *homocistinuriei*, chiar și o mică creștere a activității proteinei mutante poate avea un impact semnificativ asupra tabloului clinic al unei boli. Condiția necesară este ca mutația să nu compromită complet funcția proteinei, deci să existe un anumit nivel de activitate reziduală. O modalitate care poate avea ca rezultat creșterea nivelului funcțional al proteinei este *modularea expresiei genice*. Aceasta strategie de tratament este în studiu în cazul sicklemiei.

Sicklemia (vezi capitolul 3) este o boală determinată de o mutație punctiformă a hemoglobinei β (HbS). Două observații sugerează ca inducția unei creșteri a nivelului hemoglobinei F (HbF) – $\alpha 2\gamma 2$ – ar fi benefică pentru acești pacienți. În primul rând, HbF este perfect funcțională în transportul oxigenului către țesuturi, deși nivelul său la adult nu depășește de regulă 1% din totalul hemoglobinei. În al doilea rând, niveluri crescute ale HbF (peste 20g/100ml) par a inhiba polimerizarea dezoxi-HbS. S-a constatat că nou-născuții din mame

10. Moleculele de PEG care învelesc enzima, deși permit difuziunea substraturilor și a produșilor de reacție nu permit recunoașterea antigenelor de către componentele sistemului imun.

diabetice tratate cu butirați prezintă o întârziere a tranziției de la expresia genei pentru γ-globină către expresia β-globinei. Un număr de studii efectuate în prezent arată că administrarea de butirat la pacienții cu sicklemie crește într-adevăr expresia γ-globinei. Nu se cunosc încă beneficiile pe termen lung, și nici efectele secundare potențiale, dar aceste observații demonstrează posibilitatea reglării expresiei genelor până la un nivel ce permite obținerea unor beneficii terapeutice.

5. Terapia celulară

Transplantele de organe ori implantarea unor celule diferențiate sau celule stem se plasează la limita dintre metodele bazate pe înlocuirea proteinelor mutante și terapia genică. Pe de o parte organul sau celulele transplantate pot suplea proteina dorită, iar, pe de altă parte, are loc modificarea informației genetice la nivel somatic, deși aceasta nu este integrată în genomul gazdei. Transplantele alogenice de organ au fost utilizate cu tot mai mult succes în ultima decadă și reprezintă probabil cea mai importantă modalitate de îmbunătățire a tratamentului bolilor monogenice din ultimii 15 ani.

Diverse boli monogenice beneficiază în prezent de transplante renale, medulare sau hepatice. Dezvoltarea unor agenți imunosupresori eficienți, precum ciclosporina, alături de lipsa altor metode de tratament, a contribuit în mare măsură la creșterea interesului pentru această formă de tratament. Rata de supraviețuire a fost îmbunătățită continuu, la copii fiind mai mare de 85-90% la un an după transplantul hepatic și de 70-85% la 5 ani.

Transplantele de organ pot fi utilizate în două scopuri:

- cea mai justificată indicație este aceea a înlocuirii unui organ care a fost alterat ca urmare a bolii genetice (de exemplu, ficatul devenit cirotic ca o consecință a deficienței de α1-AT ori rinichii afectați în cistinoză);
- de asemenea, transplantele de organ pot avea ca scop asigurarea unei surse de proteină funcțională care poate astfel preveni afectarea altor organe (precum transplantele medulare în bolile de stocaj lizozomale sau talasemia β, ori transplantul hepatic pentru glicogenoza tip I).

Atunci când scopul transplantului este reprezentat de asigurarea unei surse de proteină, aceasta trebuie să fie capabilă să ajungă la nivelul tuturor țesuturilor cu semnificație fiziopatologică. Acest fapt este important în mod particular în cazul transplantelor medulare pentru bolile de stocaj lizozomale. Enzimele lizozomale de la nivelul celulelor donor trebuie să ajungă la nivelul lizozomilor unor multiple tipuri celulare. O problemă particulară este cea a compartimentului cerebral, bariera hematoencefalică fiind adeseori impermeabilă pentru proteine. Cum afectarea SNC este o trăsătură majoră în multe boli de stocaj lizozomale, orice eșec în a suplimenta nivelul proteinei la nivelul acestui compartiment poate limita sever aplicabilitatea transplantului medular ca formă eficientă de tratament.

Principalele efecte secundare pe termen lung asociate transplantelor de organ sunt atât creșterea riscului unor neoplazii maligne (în special limfoame) ca urmare a imunosupresiei prelungite, cât și riscul afectării funcției renale ca urmare a tratamentului cu ciclosporină. La aceasta se adaugă numărul limitat de organe disponibile pentru transplant. O soluție în măsură să permită eliminarea multora dintre aceste probleme ar fi cea a combinării *transplantului de celule stem cu terapia genică*. În această situație celulele stem ale pacientului însuși ar putea fi cultivate *in vitro* și utilizate pentru transfecția genei de interes, și apoi reintroduse în organismul gazdă pentru a repopula cu celule funcționale țesutul afectat. O altă soluție este cea a utilizării metodelor de *reprogramare nucleară* discutate mai sus.

6. Terapia genică

Odată cu identificarea și caracterizarea genelor implicate în diferite afecțiuni, un număr tot mai mare de boli monogenice au devenit candidate potențiale pentru implementarea unor protocoale de terapie genică. Primul trial clinic de terapie genică pentru o boală ereditară a fost inițiat în anul 1990 (deficiența adenozin dezaminazei). Cu toate acestea, progresele obținute până în prezent au fost modeste, iar durata efectelor terapeutice a fost în general scurtă. Principala problemă care trebuie să fie depășită în viitor este găsirea unor metode de eliberare a genelor care să fie mult mai eficiente. În plus, există dificultăți în abordarea terapiei genice care depind de natura particulară a genei și a mutației implicată în etiologia bolii. Până în prezent 125 de trialuri clinice, adică 7,9% din total, au avut în vedere bolile monogenice. O treime dintre acestea au avut drept țintă fibroza chistică, frecvent întâlnită în Europa și Statele Unite. Un alt grup de boli monogenice tratate prin terapia genică îl reprezintă sindroamele de imunodeficiență.

6.1. Boli monogenice pentru care există protocoale de terapie genică

Deși numărul trialurilor clinice folosite în terapia bolilor monogenice este relativ mic în raport cu cele folosite în cancer, acestea au fost primele inițiate și

BCU CLUJ / UNIVERSITY LIBRARY

cele care au adus până în prezent cele mai spectaculoase rezultate terapeutice. S-a observat că bolile recesive sunt în mod particular candidate bune pentru terapia genică. În aceste boli chiar obținerea unui nivel relativ modest al proteinei absente poate asocia beneficii clinice evidente. În schimb, bolile dominante în care boala este prezentă în ciuda existenței unei alele normale, ridică mai multe probleme întrucât este necesară atingerea dozei corecte a proteinei mutante (bolile prin haploinsuficiență) sau contracararea efectelor negative ale genei mutante (boli prin mutații cu efect dominant negativ).

a) Imunodeficiența combinată severă (*severe combined imunodeficiency* – SCID)

Primul succes definitiv în terapia genică a fost obținut prin tratarea unor pacienți cu SCID. Imunodeficiența combinată severă este un grup heterogen genetic de boli congenitale ale sistemului imunitar. Ele se caracterizează prin deficitul ambelor compartimente ale imunității, atât celular, cât și cel umoral, astfel că pacienții sunt susceptibili la întregul spectru de agenți infecțioși, la infecții recurente multiple, localizate la nivelul tegumentelor, tractusului respirator și tractusului gastrointestinal. Cea mai frecventă formă de boală este determinată de mutația genei *IL2RG* (Xq13) ce codifică subunitatea γc comună multor receptori pentru interleukine[11], inclusiv pentru IL2. O altă formă comună de boală este cea determinată de deficiența adenozin deaminazei (ADA). În această formă de boală acumularea purinei conduce la distrugerea limfocitelor T. Întrucât limfocitele T reglează activitatea limfocitelor B, este afectată funcția ambelor tipuri celulare.

Metodele de terapie genică folosite în SCID s-au bazat pe transferul efectuat *ex vivo* a unor γ-retrovirusuri. Celulele țintă folosite în aceste protocoale au fost celulele măduvei osoase, care conțin un procent crescut de celule stem hematopoietice. În timp, au fost introduse metode de izolare specifică a acestor celule stem hematopoietice, caracterizate prin expresia markerului CD34. Până în 2008 17 dintre cei 20 pacienți cu SCID legat de cromozomul X și 11 din cei 11 pacienți cu SCID prin mutația *ADA* tratați prin terapie genică au evidențiat un succes necontestabil al terapiei genice (menținerea funcției sistemului imunitar pentru perioade de peste 9 ani). Cu toate acestea, patru pacienți cu SCID legat de X tratați prin terapie genică au dezvoltat leucemie limfoblastică acută cu celule T ca urmare a activării de către secvențele promotor/activator conținute de virusul terapeutic a proto-oncogenei *LMO2* (11p13).

b) Boala granulomatoasă cronică (BGC)

BGC este o altă formă de imunodeficiență determinată de mutații ale uneia dintre cele patru gene care codifică diferitele subunități ale complexului mutiproteic NADPH oxidaza. NADPH oxidaza este implicată în producerea de radicali liberi de oxigen și alte molecule mici toxice pe care fagocitele le utilizează pentru distrugerea microbilor. Transferul pe cale retrovirală a unei transgene conținând gena mutantă a condus succes terapeutic tranzitoriu la doi pacienți adulți tratați pe această cale. Ulterior transgena a devenit însă inactivă prin metilarea ADN în regiunea promotor a genei integrate și ambii pacienți au dezvoltat mielodisplazie datorită activării proto-oncogenei EVI1. Unul dintre pacienți a decedat prin sepsis masiv la 27 luni după tratament.

c) Hemofiliile B și A

Hemofilia B este o boală recesivă legată de X determinată de o mutație a genei care codifică factorul IX al coagulării este o altă boală monogenică pentru care terapia genică s-a dovedit a avea efect terapeutic, deși rezultatele sunt încă modeste. Factorul IX al coagulării este o proenzimă care intervine în formarea cheagului de fibrină. Formele severe de hemofilie B sunt rezultatul unei reduceri a nivelelor circulante ale factorului IX sub 1% din valorile normale; nivele între 1 și 5% determină forme moderate de boală. Între 1998 și 2001 au fost inițiate trialuri clinice de terapie genică care au folosit tipuri variate de vectori: retrovirusuri, adenovirusuri, AAV sau chiar metode de transfer non-viral. La primii doi pacienți s-a utilizat injectarea intravenoasă a unui AAV ce conținea gena factorului IX al coagulării. S-a obținut un nivel circulant al proteinei de circa 1% față de normal, dar acest nivel a fost menținut pentru perioade scurte de timp, de sub trei luni. Nu s-a evidențiat dezvoltarea anticorpilor anti-factor IX. Se speră că prin creșterea dozelor de vector administrate să se prelungească perioada de eficiență terapeutică.

În ceea ce privește factorul VIII de coagulare, deficient în **hemofilia A**, transferul genei în celule țintă a ridicat unele probleme din cauza dimensiunii mult mai mari a genei comparativ cu cea a factorului IX. În plus, experimentele pe șoareci au arătat că metoda de transfer mediată de un vector non-viral este de preferat în cazul celulelor hepatice. În 2009, s-a inițiat un trial preclinic folosindu-se nanoparticule cu un înveliș hialuronic care conțineau secvența ADN a factorului VIII împreună cu un element genetic de tip transpozon numit „*Sleeping beauty*" implicat în inserția eficientă a transgenei în genomul gazdei. Celulele țintă sunt celulele endoteliale sinusoidale hepatice, principalele producătoare de factor VIII în ficat. După 50 de săptămâni s-a observat menținerea expresiei genei la șoareci.

d) Fibroza chistică (FC)

Protocoalele de terapie genică utilizate până în prezent se bazează pe administrarea cu ajutorul unui bronhoscop sau cu ajutorul aerosolilor a unui vector adenoviral ori a unor lipozomi care conțin o minigenă *CFTR*. Primele încercări au debutat în anul 1993, iar rezultatele obținute inițial au fost modeste. În cazul administrării cu ajutorul adenovirusurilor, principala problemă era răspunsul imun (dezvoltarea unei pneumonii interstițiale

11. Interleukinele sunt citokine folosite de către limfocite pentru comunicarea intercelulară.

care punea chiar probleme vitale). În schimb, administrarea cu ajutorul lipozomilor, deşi sigură, avea o eficacitate redusă a transferului genei în celulele epiteliale. În anul 2009, în urma mai multor cercetări, s-a obţinut prin mutaţii repetate ale AAV o variantă cu proprietăţi îmbunătăţite, în sensul unei creşteri a abilităţii de a infecta celulele pulmonare, repetării transferului genei *CFTR* şi al unei toleranţe mai bune din partea sistemului imun al gazdei. Rezultatele observate în culturi celulare au indicat o vindecare totală a celulelor provenite de la un pacient cu FC. La începutul anului 2010, s-a anunţat obţinerea unui lentivirus (SIV) cu un înveliş proteic de la virusul Sendai care are o eficienţă mai mare a transducţiei genei *CFTR* în celulele epiteliului pulmonar, expresia durează 15 luni şi readministrarea intranazală este fezabilă. Ca urmare, efectele terapeutice sunt relevante clinic pentru pacienţii cu FC. Reuşitele experimentale au creat chiar şi speranţa utilizării intrauterine a terapiei genice în cazul fibrozei chistice.

e) Distrofia musculară Duchenne

Principala problemă în cazul acestei boli este dimensiunea crescută a ADNc pentru distrofină – 11 kb – care depăşeşte capacitatea de transport a vectorilor retrovirali utilizaţi în prezent. În plus, aceşti vectori nu sunt capabili să pătrundă în interiorul unor celule care nu se divid, aşa cum sunt celulele musculare. De aceea, vectorii utilizaţi până în prezent sunt cei adenovirali. Natura complexă a DMD a îngreunat mult găsirea unei terapii eficiente. În momentul de faţă sunt încă în studiu terapii diferite care au fost testate cu succes pe modele animale şi care au în vedere:

1. Folosirea celulelor stem musculare (pozitive pentru markerul CD133) care, injectate direct în muşchi, au abilitatea de a se diferenţia în miotubuli şi de a stimula producţia de distrofină;
2. Utilizarea oligonucleotidelor antisens pentru a induce refacerea cadrului de lectură a genei *DMD* (de exemplu, oligonucleotidul PRO051 facilitează omiterea includerii – „exon skipping" – exonului 51 mutant al genei distrofinei în ARNm);
3. Utilizarea terapiei genice *in vivo* prin administrarea intramusculară a vectorilor AAV care transferă biostrophină (o copie funcţională a genei distrofinei) sau urotrofină (exprimată la niveluri crescute în perioada fetală) în celulele muşchilor striaţi.
4. Transferul pe cale retrovirală a unor forme trunchiate ale genei *DMD* (care codifică proteine mai scurte, asemănătoare celor caracterizate în formele Becker de boală).

f) Hipercolesterolemia familială

Primul protocol de terapie genică a fost iniţiat în anul 1992 la cinci pacienţi cu forma homozigotă de boală. Principala piedică în dezvoltarea terapiei genice în această boală este organul ţintă – ficatul. Hepatocitele nu se divid în mod normal, astfel încât utilizarea vectorilor retrovirali este ineficientă. S-a dovedit însă că hepatocitele pot fi cultivate *in vitro* şi, în aceste condiţii, vectorii retrovirali ce conţin gena *LDLR* inserată pot fi utilizaţi pentru transfer. Ulterior, celulele modificate pot fi reinserate în organism cu ajutorul unui cateter intraportal. Deşi s-a dovedit a fi eficientă clinic, invazivitatea metodei limitează mult aplicabilitatea sa.

g) Amauroza congenitală Leber

Amauroza congenitală Leber sau orbirea infantilă ereditară este o afecţiune autozomal recesivă cauzată de mutaţii ale genei *RPE65* (*retinal pigment epithelium-specific protein* 65kDa) localizată pe cromozomul 1p31. Frecvenţa este estimată la 1:80.000 nou-născuţi. Mutaţiile genei *RPE65* determină o dezvoltare anormală a fotoreceptorilor, degenerescenţă retiniană congenitală şi deteriorare progresivă a vederii. Rolul genei *RPE65* în metabolismul vitaminei A a putut fi stabilit prin folosirea şoarecilor knockout la sfârşitul anilor '90. În 2001, a fost obţinută transferarea prin terapie genică a genei *RPE65* în celulele retiniene ale unui câine din rasa Briard. Ca urmare a terapiei genice, animalul şi-a recăpătat vederea, iar după patru ani efectul transferului genic era persistent. Încurajaţi de această reuşită, dar şi de faptul că virusurile modificate pot ţinti uşor celulele retiniene, în 2007 au început trialurile clinice la om. A fost utilizat un vector viral de tip adenovirus, rAAV2-hRPE65, pentru a transporta gena normală în celulele retiniene ale pacientului. Primii pacienţi au fost trataţi în 2008, iar un an mai târziu s-a constatat că aceştia sunt sănătoşi şi că efectul terapiei genice se menţinea.

Bibliografie specifică selectivă

1. Amabile G, Meissner A. *Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine.* Trends Mol Med 2009; 15:59-68.
2. Caplen NJ. *RNAi as a gene therapy approach.* Expert Opin Biol Ther 2003; 3:575-586.
3. Czar MJ, Anderson JC, Bader JS, Peccoud J. *Gene synthesis demystified.* Trends Biotech 2008; 27:63-72.
4. Dietz HC. *New therapeutic approaches to mendelian disorders.* N Engl J Med 2010; 363:852-863.
5. Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. *Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update.* J Gene Med 2007; 9:833-842.
6. Hoffman EP. *Skipping toward personalized molecular medicine.* N Engl J Med 2007; 357:2719-2722.
7. Kiskinis E, Eggan K. *Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells.* J Clin Invest 2010; 120:51-59.
8. Li S, Ma Z. *Nonviral gene therapy.* Curr Gene Ther 2001; 1:201-226.
9. Love KT *et al. Lipid-like materials for low dose, in vivo, gene silencing.* Proc Nat Acad Sci USA, 2009; 107:1864-1869.

10. Lowenstein PR *et al. Gene Therapy*. Rimoins DL (ed.). *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*, ed. a V-a. Curchil Livingstone Elsevier, 2007, vol. I, 745-798.
11. Lewis Ricki. *Human Genetics Concepts and Applications*. ed. a VII-a. McGraw-Hill, 2007, 402-413.
12. Mitsuyasu RT *et al. Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells*. Nat Med 2009; 15:285-292.
13. Pfeifer A, Verma IM. *Gene therapy: promises and problems*. Ann Rev Gen Hum Genet 2001; 2:177-211.
14. Stoica O, Braha E, Ungureanu G. *The drug therapy at the beginning of genomic era*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi 2002; 107:240-246.
15. Tauşer G, Stoica O. *Strategia antisens*. Ed. Junimea, Iaşi, 2003.
16. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. *Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy*. Nat Rev Genet 2003; 4:346-358.
17. Treacy EP, Valle D, Scriver CR. *Treatment of genetic disease*. În Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (ed.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. ed. a VIII-a. McGraw-Hill, New York, 2001, 175-191.
18. Umov FD *et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases*. Nat Rev Genet 2010; 11:636-646.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 21

PROBLEME ŞI DILEME ETICE ÎN GENETICA MEDICALĂ

Încă de la începuturile sale ca ştiinţă, genetica umană a fost confruntată cu aspectele morale pe care astăzi le definim prin cuvântul *etică*. Astfel, Francis Galton, unul dintre întemeietorii geneticii umane, a introdus conceptul de *eugenie* ce viza „ameliorarea" populaţiilor umane prin orice influenţe susceptibile de a îmbunătăţi şi dezvolta calităţile pozitive înnăscute ale unei populaţii, inclusiv prin „încrucişări judicioase" şi/sau excluderea de la procreare a celor „inapţi". Din nefericire, în contextul sociopolitic şi ştiinţific dintre cele două războaie mondiale, conceptul de eugenie a devenit – în multe ţări – o filosofie de stat care a motivat şi generat Holocaustul în Germania nazistă şi legi de sterilizare obligatorie în alte ţări. Deşi eugenia „clasică" a devenit inacceptabilă ştiinţific, moral şi politic, genetica medicală, sfatul genetic şi, mai recent, diagnosticul prenatal sunt uneori considerate, în viziunea marelui public şi chiar a unor filosofi, ca o nouă formă de eugenie.

Dezvoltarea recentă şi extraordinară a geneticii moleculare – determinată de noile tehnologii ale ADN recombinant, de Proiectul Genom Uman (PGU) şi de aplicaţiile lor în cercetarea ştiinţifică şi practica geneticii clinice – a creat însă noi probleme şi dileme etice, a crescut nivelul de anxietate privind folosirea cunoştinţelor în mod responsabil *pentru* îmbunătăţirea sănătăţii, reducerea suferinţei şi apărarea demnităţii umane şi *nu* în detrimentul individului, familiei sale şi societăţii. Oamenii de ştiinţă au acţionat responsabil, iniţiind proiecte, directive (*UE*), ghiduri (*OMS*) şi chiar legi (*Franţa*) de aplicare a bioeticii în sfera genomului uman; astfel s-a născut şi Proiectul ELSI (de la *Ethical, Legal and Social Implications*), care studiază efectele cunoştinţelor dobândite prin PGU în diferite arii de aplicaţie, inclusiv în practica geneticii medicale, formulând recomandări şi măsuri adecvate.

Definirea „eticii" va ţine întotdeauna cont de pluralismul societăţii în care trăim, de multitudinea de opinii şi varietatea de norme morale, legale, culturale şi sociale pe care acest concept le include. Chiar dacă standardele etice se creează şi respectă la nivel personal, ele au impact asupra întregii societăţi, ale cărei atribute şi tradiţii pot diferi de cele individuale. Principiile şi teoriile etice însă vor ajuta la elaborarea unei decizii morale atunci când situaţia este dilematică, iar valorile controversate.

Etica biomedicală s-a născut ca o reacţie la intersecţia a trei câmpuri fundamentale: medicina clinică şi cercetarea medicală, filozofia şi disciplinele umaniste, sistemul de sănătate publică şi puterea politicii sanitare. Denumirea „bioetică" a fost însă introdusă în 1970 în SUA de oncologul Van Rensselaer Potter (în locul celui de morală medicală), cu rolul de a defini o nouă disciplină care să combine cunoaşterea biologică cu cea a sistemului valorilor umane. Bioetica este aşadar un studiu interdisciplinar dinamic al unor probleme create de menţinerea valorilor medicale în contextul dezvoltării ştiinţifice.

Aplicarea bioeticii în practica medicală în general şi genetica medicală în particular se bazează pe un set de *principii etice* care au stat la baza multor coduri de practică, ghiduri şi reglementări profesionale. În genetica medicală există însă destule controverse şi dileme etice, apărute atunci când unele principii par a fi sau chiar sunt în conflict unele cu altele, fapt care nu permite formularea unui răspuns tranşant; soluţia optimă actuală este de a realiza un compromis care să fie acceptat de majoritatea utilizatorilor, cu precizarea explicită că dorinţele/deciziile exprimate de pacienţi sau punctele de vedere diferite trebuie să fie respectate. În situaţiile conflictuale, etica medicală va realiza un cadru de analiză morală ce va ajuta la identificarea mai multor soluţii şi a unei decizii acceptabile din punct de vedere moral.

BCU "VICTOR BABEŞ" UNIVERSITY LIBRARY

A. Aplicarea principiilor generale ale bioeticii în genetică

Există o multitudine de principii etice aplicabile practicii medicale genetice, din care noi am selectat următoarele, ca fiind esențiale în orientarea unei decizii clinice impact moral:

(1) respectarea *autonomiei* individului;
(2) *nonvătămarea*;
(3) *beneficiul* persoanei;
(4) respectarea *confidențialității* și păstrarea *intimității*;
(5) *respectul dreptății și echității* – accesul tuturor persoanelor la servicii medicale, dublat de asigurarea că toți indivizii vor fi tratați egal și corect.

Aceste principii nu trebuie privite ca reguli sau norme rigide, ci doar ca un cadru care facilitează analiza unor situații ce presupun combinarea valorilor diferite și ajută la decantarea a ceea ce este corect și acceptat (sau acceptabil) în raport cu ceea ce este incorect sau nedrept.

1. Respectarea autonomiei

Prin autonomie se înțelege dreptul unei persoane de a decide singură, fără nici o constrângere; luarea deciziei se bazează pe **consimțământul informat**, în condiții de confidențialitate și respect pentru problemele personale.

Principiul suprem în medicină este *respectarea demnității pacientului*. „Respectul persoanei" este fundamentul relației medic – pacient și el include două cerințe morale distincte: necesitatea de a respecta autonomia și necesitatea de a-i proteja pe cei cu autonomie redusă. În bioetică, conceptul autonomiei este considerat punctul culminant al înălțimilor moralei.

Autonomia este sinonimă cu autoguvernarea, reflectând dreptul pacientului de *a decide singur, fără nici o constrângere*. Respectarea autonomiei derivă din recunoașterea faptului că individul este capabil să judece, să decidă liber (voluntar) și să acționeze, controlându-și propriul destin. În esență, autonomia este un *drept negativ*, definindu-se prin libertatea de a nu fi supus constrângerilor impuse de către ceilalți. O persoană poate fi considerată autonomă dacă este capabilă să aleagă între un set de opțiuni, reflectând și deliberând în același timp asupra alegerii sale. Un pacient autonom nu este acela care refuză, ci o persoană suverană pe întreaga sa capacitate de decizie. Din această perspectivă putem afirma că autonomia este și un *drept pozitiv*, dreptul la autodeterminare, la exprimare și la alegere.

În genetică acest principiu impune medicului *responsabilitatea de a asigura înainte de testare toate informațiile necesare* privind procedura ce urmează a fi aplicată, pentru ca pacientul să poată judeca independent și să poată lua o decizie informată, fie dându-și consimțământul (informat), fie refuzând informat. După ce studiile genetice au fost efectuate, pacientul are dreptul să obțină *informații complete în legătură cu rezultatele* care ar putea fi importante pentru sănătatea lui și/sau a copiilor lui. Cel care acordă asistența medicală este *obligat să explice pacientului*, complet și corect, *beneficiile și riscurile procedurii*, pentru ca pacientul să ia o decizie informată; în plus, medicul trebuie să aibă o atitudine *nondirectivă*. În același timp, pacientul se poate prevala de *dreptul „de a nu ști"* care sunt rezultatele testărilor. În cazul refuzului, consilierul este obligat să nu-i transmită rezultatele investigațiilor genetice.

În cercetările genetice, problemele legate de consimțământul informat sunt mai complexe. Participantul la studiu va trebui informat despre natura studiului, cine și unde realizează cercetarea, rezultatele și implicațiile lor asupra individului și familiei sale, modul de stocare a ADN și posibilitatea utilizării lui ulterioare. Testarea va fi anonimă, iar rezultatele confidențiale.

2. Non-vătămarea și beneficiul persoanei

Principiul *beneficiului* înseamnă *„a face bine"* pentru pacient (maximizarea efectelor oricărei intervenții) și este o normă etică considerată de către unii filosofi drept o obligație morală; el se corelează intim cu principiul *„a nu face rău"*, inclus încă din Antichitate în Jurământul Hipocratic. Non-vătămarea este de fapt o variantă a principiului beneficiului (promovarea binelui) apărut ca o reacție la situațiile în care „a face bine" nu este întotdeauna în interesul pacientului. Este vorba de cazurile în care forma de bine acceptată sau dorită de pacient nu se suprapune cu interesul medical și, în viziunea medicului, se poate transforma în „a face rău".

În general, o conduită non-vătămătoare are o stringență mai mare (*primum non nocere*) decât una care vizează simplul rol benefic, chiar dacă din punct de vedere utilitarist scopul urmărit s-ar putea obține doar acționând activ spre a face bine.

Beneficiul impune pe lângă respectarea autonomiei și evitarea vătămării o contribuție activă la bunăstarea individului.

3. Păstrarea confidenţialităţii şi respectarea intimităţii

Respectarea confidenţialităţii şi păstrarea intimităţii pacientului sunt principii obligatorii în cursul oricărei activităţi medicale şi sunt stabilite de *Codul Deontologic*. Bineînţeles, aceste principii se aplică şi în genetica medicală. Datele genetice trebuie să fie *protejate* de interesele unei terţe părţi. Ele nu pot fi dezvăluite decât în circumstanţe speciale, atunci când individul a fost pe deplin informat asupra utilităţii folosirii lor şi după ce acesta şi-a dat *acordul în scris*. Chiar şi în acest caz, înainte ca medicul să dezvăluie datele referitoare la pacientul său, el trebuie să hotărască dacă aceste date sunt *absolut relevante* pentru cei cărora li se vor dezvălui aceste informaţii.

Confidenţialitatea *nu este un principiu absolut*. Multe coduri, care o reglementează, conţin *circumstanţe speciale* pentru situaţiile în care aceasta poate fi încălcată.

- Există cazuri când o informaţie considerată personală poate fi relevantă pentru viaţa altei persoane. Consecinţele benefice ale păstrării confidenţialităţii pot fi astfel depăşite de consecinţele nefaste. Punerea în pericol a sănătăţii unei persoane este un argument suficient pentru a autoriza dezvăluirea unor date genetice, în funcţie de gravitatea şi probabilitatea pericolului.
- Informaţiile ce rezultă din investigaţiile genetice sunt importante nu numai pentru sănătatea, viaţa şi planurile reproductive ale pacientului investigat, dar şi pentru *familia* şi rudele acestuia. Astfel, a nu dezvălui unei persoane informaţii ce pot influenţa alegerea ei şi luarea unei decizii informate constituie o încălcare a drepturilor sale. De aceea, geneticienii sunt obligaţi *să aplice cu grijă* aceste principii şi să le interpreteze restrictiv în caz de dubiu.

4. Respectul dreptăţii şi echităţii

Principiul dreptăţii şi echităţii se referă la modul în care un individ este tratat în contextul întregii societăţi. El porneşte de la prezumţia că *toţi cetăţenii sunt egali în faţa legii*, au aceleaşi drepturi politice şi acces egal la serviciile publice şi bunurile sociale. Echitatea a fost definită drept *ceea ce se cuvine, se merită şi este corect*.

În sistemul medical, dreptatea şi echitatea se referă la faptul că toţi membrii societăţii au un *acces egal la îngrijirile medicale* şi sunt trataţi în acelaşi mod, fără discriminare, corect, beneficiind în egală măsură de progresele medicinii. Această premiză este valabilă şi pentru *accesul la serviciile de genetică*.

Destul de des însă, principiul dreptăţii şi echităţii rămâne doar *un ideal*, mai ales în condiţiile în care resursele sunt insuficiente, iar competiţia pentru dobândirea lor este acerbă. Există opinii, ce se constituie în veritabile semnale de alarmă, potrivit cărora inegalităţile sociale vor influenţa accesul la tehnologiile moderne – eficace, dar scumpe –, iar acestea, la rândul lor, vor accentua inegalitatea socială. Opţiunea depăşirii acestui cerc vicios ar fi ca resursele (puţine) pentru sănătate *să fie utilizate echitabil, pe baza nevoilor*.

Numărul mic de specialişti, servicii şi laboratoare de genetică medicală, consecinţa unei politici sanitare defectuoase şi finanţării inadecvate a programelor de profilaxie genetică, creează din start *inechitate şi injustiţie* prin reducerea accesului la servicii şi a posibilităţilor de a beneficia de progresele geneticii pentru îmbunătăţirea sănătăţii individului şi familiei. La aceasta se poate adăuga *riscul stigmatizării* sociale, datorită bolilor genetice, şi al *discriminării* la angajare sau asigurări medicale („evitarea" persoanelor care au boli sau chiar vulnerabilităţi/predispoziţii genetice la anumite boli comune ale adultului), prin încălcarea caracterului privat al informaţiei genetice şi violarea intimităţii.

5. Dileme şi conflicte etice

Există numeroase controverse şi dileme etice, când unele principii par a fi/sunt în conflict unul cu altul şi nu se poate da un răspuns tranşant. Soluţia optimă actuală este de a realiza *un compromis* care să poată fi acceptat de majoritatea utilizatorilor, cu precizarea explicită că dorinţele/deciziile exprimate de pacienţi sau punctele de vedere diferite să fie respectate.

În subcapitolul următor vom analiza ţintit diverse dileme şi controverse etice privind diferite activităţi practice de genetică medicală, dar acum vom prezenta situaţiile mai frecvente, mai generale, care se întâlnesc nu numai în genetică, ci şi în alte arii ale medicinii.

a) Autonomie *versus* paternalism

Respectul autonomiei sau a dreptului pacientului de a face o alegere informată şi de a decide singur, fără nicio constrângere, poate intra în conflict cu atitudinea *paternalistă* a unui medic care, în numele autorităţii şi profesionalismului său, recomandă, făcând chiar uz de autoritatea sa, un anumit curs al acţiunii. Această atitudine „directivă" din sfatul genetic exprimă o convingere personală.

O altă situaţie similară apare în recomandarea de testare a copiilor cu risc de a dezvolta o boală genetică ce debutează la vârsta adultă, ştiind că ei nu sunt suficient de maturi pentru a-şi da un consimţământ informat. Deşi acest conflict între autonomie

şi paternalism este inevitabil în anumite arii ale geneticii, conduita standard în genetica medicală este sfatul nondirectiv imparţial şi neutru. Principiul autonomiei personale nu poate fi, evident, aplicat nou-născuţilor şi copiilor mici. În aceste cazuri, părinţii sunt cei care trebuie să fie corect informaţi şi care vor decide dacă acceptă sau nu transmiterea informaţiei altor membri ai familiei.

b) Beneficiu *versus* non-vătămare

Conflictul dintre beneficiul posibil al unei acţiuni medicale şi riscurile sale („vătămarea") pentru pacient este relativ frecvent. De exemplu, solicitarea de către sau pentru pacienţii cu o afecţiune gravă a unei terapii experimentale cu risc înalt de a avea efecte nocive. Regula de aur este *primum non nocere*, deci non-vătămarea înaintea beneficiului.

> Nu putem spune, firește, că o persoană este imorală dacă nu reuşeşte să producă un beneficiu prin acţiunile sale. Este posibil să nu faci rău nici unei persoane niciodată, dar este *imposibil să faci bine oricând şi pentru oricine*. În încercarea de a diferenţia datoria de virtute şi de a clarifica dacă a face bine este un merit sau o obligaţie morală, Peter Singer (1972) apreciază: *„Dacă ne stă în puteri să prevenim răul fără a sacrifica nimic de importanţă morală comparabilă, atunci avem datoria morală să o facem"*.

Astfel de controverse impun clarificarea şi chiar specificarea/exemplificarea tipurilor de acţiuni benefice, menţionând limitele obligaţiilor noastre, precum şi pragul de la care producerea beneficiului este mai curând o opţiune decât o obligaţie.

c) Beneficiu *versus* autonomie/confidenţialitate

În esenţă, *a face bine* poate include protejarea şi apărarea drepturilor altora, prevenirea răului sau îndepărtarea condiţiilor de producere a unor evenimente nefaste, ajutorarea persoanelor în dificultate sau cu handicap sau salvarea persoanelor aflate în pericol iminent. Astfel de acţiuni benefice pot intra în conflict cu principiul autonomiei şi/sau cu cel al confidenţialităţii. Opţiunea unei persoane poate compromite sănătatea unui alt individ.

În genetica medicală, asemenea conflicte se pot produce mai ales atunci când rezultatele testelor genetice ale unei persoane (de exemplu, o mutaţie dominantă sau o translocaţie echilibrată) sunt importante nu numai pentru sănătatea, viaţa şi planurile reproductive ale pacientului investigat, dar şi pentru rudele acestuia. A nu dezvălui unei terţe persoane din familie informaţii care pot influenţa luarea unei decizii informate constituie o încălcare a drepturilor sale. *Pacientul trebuie sfătuit şi încurajat să transmită informaţii rudelor sale cu risc* sau să-şi dea acordul pentru ca această comunicare să fie realizată de către genetician. Dacă acest lucru nu se întâmplă şi pacientul refuză categoric dezvăluirea datelor genetice personale importante pentru sănătatea rudelor sale, recomandările etice ale diferitelor comisii internaţionale agreează ideea că geneticianul poate contacta rudele pacientului prin intermediul medicului de familie.

O situaţie asemănătoare de conflict între autonomia pacientului şi beneficiu este reprezentată de cazurile în care diagnosticul prenatal evidenţiază la făt o anomalie care nu este gravă sau poate fi corectată (de exemplu, despicătură labială), iar părinţii, în virtutea autonomiei deciziei reproductive, hotărăsc întreruperea sarcinii.

Paradoxal, în multe alte cazuri o acţiune benefică pentru individ poate fi „interzisă" de principiul autonomiei (dreptul pacientului de a decide) şi/sau cel al confidenţialităţii („divulgarea" informaţiei medicale numai cu permisiunea pacientului). Limitele confidenţialităţii medicale ar trebui explicate pe larg pacienţilor, astfel încât aceştia să poată avea o viziune cât mai clară asupra situaţiilor în care informaţiile furnizate medicilor ar putea fi difuzate şi altor persoane.

d) Autonomie *versus* non-vătămare

Acest conflict etic se poate produce atunci când un pacient cu risc de a face o boală gravă (de exemplu, boala Huntington sau diferite forme de cancer ereditar) doreşte să-şi cunoască „statusul" genetic, dar medicul apreciază că aceasta dezvăluire ar putea produce „vătămarea" persoanei (schimbarea stilului de viaţă, riscul de sinucidere etc.). În aceste cazuri se consideră că dreptul persoanei la informaţie este primordial, medicul trebuind să practice testul şi să-i comunice pacientului un eventual rezultat care „ar face rău".

6. Datoriile medicilor confruntaţi cu pacienţi cu boli genetice

Multe dintre problemele practice şi etice privind consilierea genetică şi managementul bolilor genetice sunt uşurate prin cunoaşterea tuturor responsabilităţilor medicale.

Obligaţiile medicilor – legate de probleme etice – sunt următoarele:

- Medicii au datoria de a da viitorilor părinţi informaţiile de bază care să le permită să ia o decizie bună asupra conceperii unui copil, în cunoştinţă de cauză. Dând cuplurilor aceste informaţii, medicii trebuie să respecte principiile etice şi normele profesionale ale practicii medicale existente în comunitate

şi stabilite de asociaţia medicală naţională sau de organizaţia medicală competentă.

- Medicul are datoria de a informa pacienţii atunci când cunoaşte anumiţi factori genetici având potenţialul de a conduce la boli genetice grave sau la boli congenitale ce ar putea afecta copiii pacientului sau alţi membri ai familiei.
- Medicul trebuie să acorde sfaturi genetice sau să trimită pacientul la un medic genetician pentru aceste sfaturi; pacientul trebuie încurajat, atunci când este cazul, să transmită informaţiile dobândite rudelor sale, dacă acestea au un risc genetic crescut. În acest caz, medicul trebuie să discute şi cu restul familiei celui consiliat sau să-i îndrume spre genetician.
- Medicul care, din raţiuni morale, se opune contracepţiei, avortului, sterilizării trebuie să evite să-şi impună valorile sale morale personale şi să substituie propria judecată morală aceleia a viitorilor părinţi. El poate refuza să ofere asistenţă, dar are obligaţia să avertizeze viitorii părinţi că există o problemă genetică potenţială şi să informeze pe cei în cauză că este bine să ceară părerea altui medic specialist.
- Medicul nu trebuie să încalce dreptul la confidenţialitate al pacientului dacă nu a discutat în prealabil cu el acest lucru. Dacă, în ciuda încurajărilor primite din partea medicului, pacientul refuză să informeze sau să implice membrii familiei, atunci medicul este îndreptăţit să dezvăluie parţial secretul medical unei terţe părţi, dacă este în interesul ei maxim să cunoască informaţia genetică.

B. Probleme etice specifice unor activităţi de genetică medicală

Progresele recente extraordinare ale geneticii medicale au permis nu numai o cunoaştere mai profundă a etiopatogeniei multor boli, ci şi o îmbunătăţire remarcabilă a posibilităţilor practice de diagnostic, management şi profilaxie a bolilor. Ele au generat însă şi numeroase dileme şi controverse etice. Vom încerca o prezentare sintetică a acestor aspecte, în diferite activităţi practice ale geneticii medicale, cu intenţia unei mai bune informări şi a optimizării acţiunilor celor implicaţi.

1. Sfatul genetic

În anul 1975, un comitet de experţi ai Societăţii Americane de Genetică Umană a definit sfatul genetic *„...ca un proces de comunicare care se ocupă de problemele umane asociate cu manifestarea sau cu riscul de apariţie a unei boli genetice într-o familie..”* (vezi detalii în capitolul 10).

În definiţie se subliniază că sfatul genetic este *un proces de comunicare* (realizat prin variate mijloace), precum şi faptul că pacientul va lua o *opţiune/decizie informată* în funcţie de situaţia familială şi convingerile sale. Etica sfatului genetic dă astfel prioritate principiului *respectării autonomiei* pacienţilor, deci a libertăţii de decizie – informată, independentă, fără nici o constrângere – şi a protejării confidenţialităţii. În aceste condiţii, regula fundamentală a sfatului genetic este de a fi *nondirectiv*, imparţial, neutru. Astfel, sfatul genetic se deosebeşte radical de modelul directiv al practicii medicale tradiţionale.

Pentru a înţelege mai bine aceste aspecte, vom face câteva comentarii.

- Sfatul genetic este în esenţă *un proces de comunicare*, de informare a indivizilor despre natura bolii şi proporţia riscului genetic la care trebuie să facă faţă, oferindu-le posibilele opţiuni pe care le au în această direcţie (acceptarea riscului şi naşterea unui copil, decizia de a nu avea copii, diagnosticul prenatal şi avortul selectiv, folosirea de ovule/spermă de la donatori care nu sunt purtători de gene anormale). Pentru a permite o decizie informată, rolul consilierului este să furnizeze consultanţilor *informaţii clare, complete, corecte şi nepărtinitoare*. În plus, el trebuie să răspundă la întrebările şi preocupările lor, să combată sentimentul de vinovăţie sau ruşine ce poate apărea uneori, contribuind astfel la păstrarea integrităţii familiei. Pentru a reduce la minimum riscul de influenţare, sfătuitorul va comunica informaţia *în termeni cât mai neutri*. Informarea inadecvată poate compromite principiul autonomiei pacienţilor.
- *Hotărârea finală trebuie să aparţină numai individului/cuplului*, fără nici o recomandare din partea consilierului. Este evident de ce trebuie să fie aşa. O decizie conştientă de a avea copii depinde de mulţi factori subiectivi, incluzând relaţia dintre parteneri, dorinţa individuală şi a cuplului, bunăstarea economică şi socială. *Numai indivizii avizaţi pot lua aceste decizii împotriva riscurilor genetice.* În situaţia în care cuplul cere în mod expres o recomandare, consilierul care refuză acest lucru

ar trebui să explice cauza acestui refuz (de exemplu, în virtutea valorii neutralității și a non-interferenței cu părerile personale, intime). Un refuz „abrupt" ar putea crea sentimental de abandon sau chiar rătăcire prin noianul de informații foarte tehnice. Dacă totuși consilierul acceptă să dea o recomandare, aceasta trebuie raportată la situația sa personală, și descris în baza căror considerente *proprii* ar urma o anumită opțiune (valorile spirituale, sociale, materiale, familiale etc.).

- *Sfatul genetic nondirectiv* s-a dezvoltat ca un mijloc de a promova luarea unei decizii informate și independente de către pacienți, respectând astfel autonomia lor, evitând/reducând la minimum riscul manipulării sau coerciției. *Medicul va sprijini necondiționat opțiunile consultanților*, nu va judeca alegerea lor și va respecta decizia reproductivă pe care au luat-o pe baza credințelor, tradițiilor culturale și valorilor morale ale individului implicat. Nu trebuie să se înțeleagă că sfatul genetic non-directiv înseamnă prezentarea informațiilor și apoi abandonarea indivizilor sau a familiilor care trebuie să ia deciziile fără nici un ajutor. Pacienții doresc deseori să stea de vorbă cu cineva care să le asculte îngrijorările, care să-i ajute să se exprime și să-și înțeleagă propria valoare.

Sfatul genetic nondirectiv este un standard recomandat de către experții/comisiile de bioetică și, în general, respectat de majoritatea geneticienilor, mai ales atunci când sunt de luat decizii reproductive (sfatul genetic prenatal și sfatul genetic „pediatric"). Trebuie să recunoaștem însă că *nondirectivitatea are limite practice și etice.*

Sfatul genetic nondirectiv nu satisface întotdeauna nevoile pacienților. Având în vedere complexitatea informațiilor genetice și nefamiliaritatea pacienților cu aceste date, înțelegerea gradului riscului genetic este variabilă și subiectivă, depinzând de situația indivizilor. Unii pacienți nu le înțeleg complet sau nu le pot interpreta adecvat și atunci se creează posibilitatea de a lua o decizie parțial informată. Alteori, ei sunt nesiguri de capacitatea lor de a decide independent și nu doresc să ia singuri o hotărâre, considerând că geneticianul, ca expert, ar trebui să-i ajute. Se întâmplă adesea ca, după discuție, pacienții să întrebe medicul genetician *ce ar face el dacă ar fi în aceeași situație*. Momentul este delicat:

- unii „consilieri" – obișnuiți cu atitudinea paternalistă (de „a călăuzi pașii pacientului") din celelalte specialități „negenetice" – spun deschis care ar fi acțiunea/opțiunea lor, de obicei fără nici o altă încercare de a o impune;
- alții – adepți absoluți ai sfatului nondirectiv – refuză acest lucru: *„eu nu sunt în situația să vă spun ceea ce dvs. ar trebui să faceți"*; deseori, pacienții sunt dezamăgiți, consideră că sfătuitorii poate nu le-au spus tot adevărul și că nu-și respectă obligația de a-i ajuta. Poziția nondirectivă este uneori catalogată ca *fugă de responsabilitate* sau nerespectarea obligațiilor profesionale;
- alții nu evită situația și încearcă să identifice factorii psihologici și emoționali care au determinat punerea întrebării.

Totuși, sunt situații în care cel puțin unii „consilieri" *acționează directiv*, recomandând anumite teste sau intervenții benefice pentru pacient (de exemplu, evitarea teratogenilor, administrarea preconcepțională de acid folic, recomandarea unor îngrijiri medicale speciale ș.a.).

Dezvoltarea testelor genetice predictive pentru anumite boli ereditare sau susceptibilități la boli comune multifactoriale are multiple implicații medicale, psihologice și sociale. În acest context, sfatul genetic devine un proces mai complex deoarece apare un conflict între cei care susțin transmiterea informației genetice în mod nondirectiv, pentru a păstra neutralitatea și a respecta autonomia de decizie a pacientului, și cei care consideră că sfatul genetic ar trebui să fie mai directiv (cel puțin în situațiile care nu privesc reproducerea umană).

Timp de jumătate de secol, nondirectivismul a fost principiul etic central al sfatului genetic. Paradoxal, în definirea acestui principiu accentul cade pe ce *nu ar trebui să facă sfătuitorul*: să nu-și exprime părerile sau convingerile, să nu spună consultantului ce să facă etc. Treptat, s-a ajuns însă la concluzia că *nu este posibil un sfat genetic complet nondirectiv* deoarece atitudinile sau valorile medicului vor *răzbate cu siguranță,* în ciuda eforturilor sale de a rămâne sau părea neutru; sfătuitorul alege inevitabil o *anumită modalitate de prezentare* a informațiilor, în finalul căreia se va sugera o soluție potrivită. Este posibil ca geneticianul să influențeze alegerea pacientului *în diferite grade*, dar recomandarea experților de a se încerca maximizarea autonomiei consultantului, a deciziei proprii, rămâne totuși valabilă. În aceste condiții, conceptul de *„sfat genetic directiv"* începe să se nuanțeze, el fiind rezervat numai pentru *comunicarea persuasivă a informațiilor*, prin care se încearcă *în mod deliberat* să se influențeze autonomia de decizie a individului (se practică deci o *coerciție informațională*).

Recent, s-a propus chiar înlocuirea conceptului de nondirectivism ca principiu central în practica geneticii clinice și sfatului genetic cu un concept nou, *psihosocial*, care presupune că în fiecare etapă a procesului de consiliere se acordă o atenție particulară nevoilor psihologice și sociale ale pacientului. În aceste

condiţii, *sfatul genetic este redefinit ca un proces psiho-socio-educaţional de transmitere şi prelucrare a unei informaţii genetice*. Abordarea psihosocială *nu înseamnă eliminarea conceptului de nondirectivism*, deoarece sfătuitorul trebuie să furnizeze informaţii echilibrate, să sprijine autonomia de decizie a consultanţilor fără a le impune punctul său de vedere.

Situaţia este valabilă mai ales pentru cazurile în care deciziile nu implică opţiuni reproductive, în diferite tipuri de testare a susceptibilităţii la cancer sau boli comune în care sunt posibile anumite intervenţii medicale. În aceste situaţii, cunoştinţele, experienţa clinică şi recomandările medicului pot ajuta pacientul să ia o decizie finală adecvată.

Sfatul genetic devine astfel *deliberativ* sau *coparticipativ* şi implică în luarea deciziilor atât pacientul, cât şi medicul (eventual şi alte persoane). El creşte autonomia pacientului deoarece acesta este liber să interpreteze informaţiile în funcţie de propriile sale interese şi valori, dar medicul îl asistă, îl sprijină în situaţiile critice.

În procesul de *decizie coparticipativă*, ambele părţi se vor angrena treptat în procesul de luare a deciziei, etapele principale fiind: conturarea şi prezentarea opţiunilor, identificarea preferinţelor şi furnizarea de informaţii individualizate, verificarea înţelegerii informaţiei şi reacţiilor (idei, temeri, speranţe legate de opţiunile prezentate), formularea deciziei alese. În mod ideal decizia finală va trebui să aibă acordul ambelor părţi. Decizia coparticipativă nu trebuie considerată un set prescriptiv de reguli, ci ca un concept care permite conduitei non-directive să fie aplicată ori de câte ori este relevantă. Ea trebuie, de asemenea, să permită medicului să contribuie prin opinia sa profesională (o perspectivă biomedicală activă) la procesul de luare a deciziei, fără a nega importanţa sistemelor de valori ale pacienţilor. Aşadar, se va armoniza ceea ce este în beneficiul medical al pacientului cu dreptul său clar la autonomie. Această tactică de încurajare a discuţiilor cu pacienţii, premergătoare deciziei, este numită şi **etică preventivă**.

O problemă particulară cu care se poate confrunta cel care acordă sfat genetic este reprezentată de *informaţiile incidentale* care nu au legătură directă cu solicitarea consultanţilor (nonpaternitate, starea de purtător, o altă boală ş.a.). În aceste cazuri, consilierul trebuie să facă distincţia între informaţia explicit cerută şi alte informaţii obţinute întâmplător şi apoi să le aleagă pe cele care ar putea fi relevante pentru sănătatea pacientului şi să le ignore pe cele care nu sunt importante pentru decizia ce urmează a fi luată.

O situaţie specială cu care se poate confrunta medicul care acordă sfat genetic este cea a **căsătoriilor consangvine**. Sfatul genetic poate fi solicitat pre-nupţial, partenerii ştiind că au un anumit grad de rudenie. Alteori, cuplul recunoaşte înrudirea abia după ce s-a născut un copil malformat în familie. În aceste situaţii, deseori, soţii sunt tentaţi să nege înrudirea dintre ei. Unii o fac de ruşine, alţii de neîncredere sau chiar de teamă., cu atât mai mult cu cât ei ştiau sau bănuiau „ceva" despre riscul căsătoriilor consangvine. Dacă un cuplu consangvin are copii afectaţi, deseori sunt copleşiţi de un sentiment de culpabilitate. Convorbirea cu membrii cuplului cere mult tact, răbdare şi, nu odată, reveniri. În multe cazuri, cele mai preţioase date se obţin abia după cea de a doua sau chiar a treia rundă de convorbiri. Cel mai adesea, teama şi neîncrederea sunt legate de faptul că un „secret" ştiut până acum numai de ei, ar putea deveni public. Uneori, teama izvorăşte din faptul că ei nu declaraseră, la căsătoria religioasă, gradul de rudenie. Reţinerile merg până la teama de sancţiuni sociale, religioase sau administrative. Există şi situaţii în care ancheta familială este considerată o impietate, cerându-se medicului „să nu dezgroape morţii".

În ce priveşte *riscul de recurenţă*, acolo unde diagnosticul a fost corect pus, aprecierea lui nu întâmpină dificultăţi. Comunicarea riscului necesită în schimb mult tact, adaptat personalităţii cuplului sau fiecăruia din membrii familiei. Când sfatul genetic se adresează însuşi pacientului, şi dacă acesta este descendentul unei căsătorii consangvine, se evită, sub orice formă, imputarea handicapului celor doi părinţi (nici cel puţin a sugera o posibilă legătură cauzală), existând riscul unor adevărate drame familiale.

În sfatul pre-marital partenerii vor fi informaţi că, în general, au un risc mai mare de a da naştere unor descendenţi anormali, decât riscul din populaţia generală. Dacă ne referim însă la o anumită boală, existentă în familie, datele privind riscul de recurenţă, devin mult mai exacte şi ele trebuie comunicate ca atare cuplului. Desigur, după o corectă şi completă informare, vom lăsa întotdeauna libertatea cuplului să-şi asume riscul.

Un aspect particular îl regăsim în cazul *căsătoriilor consangvine din izolatele genetice*. Aici apare tentaţia de a generaliza sfatul genetic pentru întreaga populaţie a izolatului, de a extinde interdicţia oricărei căsătorii endogame şi de a fi acceptate numai căsătoriile exogame. Practic, relaţiile interumane de cunoaştere şi de apropiere între parteneri, în sânul comunităţii de convieţuire, fac aproape imposibilă o asemenea atitudine. Motivaţia căsătoriei este, de cele mai multe ori, mult mai complexă decât o simplă dorinţă de apropiere fizică sau spirituală. De aceea considerăm că sfatul genetic trebuie strict individualizat şi că o propagare „în masă" a unui principiu restrictiv de endogamie, ar fi o eroare. Desigur, sunt limite impuse de rigori legislative (de exemplu, incestul) sau de rigori religioase. În afara lor însă, sfatul genetic trebuie să aparţină strict specialistului

autorizat în acordarea unui sfat genetic competent şi corect, iar individualizarea lui trebuie să constituie o regulă.

Respectarea strictă a principiului autonomiei cuplului implică dezvăluirea tuturor informaţiilor, care, în funcţie de caracterul lor, vor fi transmise fie ambilor parteneri, fie numai celui implicat. O abordare mai flexibilă, în acord cu tradiţia medicală, care presupune un grad de încredere între medic şi pacient, este ca geneticianul să decidă ce informaţii incidentale ar trebui discutate, bazându-se nu numai pe judecata sa profesională şi pe ceea ce crede el că ar fi util pentru cuplu, ci mai ales pe informaţiile relevante. În acest caz, *principiul beneficiului primează asupra autonomiei*, dar există riscul netransmiterii unor informaţii pe care pacientul le consideră importante, iar medicul nu.

Dacă vor fi dezvoltate tacticile *etice preventive*, atunci „povara" deciziilor legate de dezvăluirea informaţiilor incidentale ar putea fi împărţită între consultant şi consilier. Mulţi pacienţi împărtăşesc acest punct de vedere şi spun: *„Ceea ce căutăm noi într-o relaţie profesională este ca cineva să ne răspundă la întrebări şi să ne ajute să avem grijă de noi. Mai simplu spus, noi dorim ca mecanicul să ne spună când frânele sunt uzate, chiar dacă l-am rugat să schimbe numai uleiul"*.

2. Testarea genetică

Testarea genetică este o denumire generică pentru orice „analiză a ADN, ARN şi a cromozomilor umani, precum şi a unor proteine sau metaboliţi – pentru a detecta mutaţiile, genotipurile unor boli ereditare sau anomaliile cromozomilor – *în scopuri clinice*" (Burke, 2002). Folosind o gamă largă de tehnici, testarea genetică permite:

- confirmarea diagnosticului la diferite categorii de pacienţi – nou-născuţi, copii şi adulţi – cu semne şi simptome sugestive pentru o boală genetică;
- determinarea prenatală a riscului viitorilor copii;
- identificarea unor riscuri posibile pentru sănătatea unor membri ai familiei bolnavului – în această categorie se includ: diagnosticul presimptomatic al persoanelor cu risc crescut de a moşteni o mutaţie dominantă, identificarea heterozigoţilor pentru unele boli recesive autozomale sau legate de X, depistarea unor persoane cu forme fruste/uşoare de boală, identificarea purtătorilor sănătoşi de anomalii cromozomiale echilibrate;
- îmbunătăţirea îngrijirilor preventive în unele boli comune ale adultului prin identificarea persoanelor ce poartă gene de risc;
- predicţia unor răspunsuri inadecvate la administrarea unor medicamente.

Testările genetice au ameliorat decisiv calitatea diagnosticului, devenind esenţiale pentru îngrijirea adecvată a pacienţilor şi familiilor lor. Totuşi, testările genetice ridică probleme etice şi psihologice. Ele sunt legate în special de: comunicarea informaţiilor despre test şi rezultate, confidenţialitatea informaţiilor genetice, caracterul voluntar al solicitării testării, responsabilitatea către alţi membri din familia biologică, impactul psihologic al testului. Precauţii suplimentare se impun atunci când se ia în considerare *testarea copiilor*, dar această problemă o vom discuta într-o secţiune distinctă.

2.1. Norme etice generale privind testarea genetică

Recomandările internaţionale ce vizează reglementarea etică a testării genetice accentuează faptul că aceste teste vor fi efectuate *voluntar, numai în scopuri medicale*, iar cei care efectuează aceste teste trebuie să garanteze *siguranţa şi calitatea procedurii.*

> Testarea genetică se va face numai în *laboratoare acreditate*, de către un personal a cărui competenţă este *confirmată* şi pe baza unor *protocoale* obligatorii aprobate de o comisie instituţională care va efectua periodic un *control de calitate* şi va valida calitatea rezultatelor obţinute.

Testarea genetică *nu va fi oferită niciodată fără un sfat pretestare*. Procesul de consiliere se desfăşoară în două etape, înainte şi după testare (caseta 21.1).

Înainte de testare – pentru a obţine un consimţământ informat – medicul trebuie să explice pacientului sau părinţilor săi complet şi corect:

- scopul testării, beneficiile şi riscurile (psihologice, sociale), şansa unei predicţii corecte (inclusiv posibilitatea unor rezultate ambigue), eficacitatea şi limitele testului;
- implicaţiile/consecinţele ulterioare individuale şi familiale;
- opţiuni şi alternative la testare – inclusiv opţiunea *de a nu face* testul.

Informaţiile vor fi transmise *non-directiv*, fără nici o recomandare, mai ales în cazul testelor ce pot influenţa o decizie reproductivă sau ale testelor pentru boli netratabile. O situaţie aparte apare în cazul testelor ce oferă oportunităţi de prevenire a bolii sau de îmbunătăţire a îngrijirilor, în care tot mai mulţi consilieri preferă un sfat „suportiv" care să sprijine eventual luarea unei decizii pozitive.

După testare, consilierea este la fel de importantă, iar discuţiile cu pacientul se vor orienta pe trei probleme.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

CASETA 21.1

Probleme etice în testarea genetică a unei familii cu ADPKD

S.A., de 55 de ani, se ştie hipertensiv de 5-6 ani; cu ocazia unui bilanţ clinic şi paraclinic se descoperă, prin ecografie abdominală, rinichi mari, polichistici, precum şi imagini chistice hepatice. *Probele funcţionale renale sunt uşor alterate. În aceste condiţii, se pune diagnosticul de boală polichistică renală autozomal dominantă (ADPKD), hipertensiunea fiind forma de debut a bolii, şi pacientul este trimis pentru sfat genetic la Centrul de patologie genetică Iaşi.*

*Anamneza familială relevă că tatăl pacientului a decedat la 45 de ani (!) datorită unui „*accident vascular cerebral*" (?), fără a se şti hipertensiv sau renal; mama, o soră şi cei trei copii ai pacientului sunt aparent sănătoşi. În contextul diagnosticului de ADPKD – ţinând cont de faptul că „*orice bolnav are un părinte afectat*", precum şi de manifestările extrarenale ale bolii, ce include anevrisme intracerebrale – se poate considera că tatăl pacientului a avut probabil ADPKD.*

Pacientul este informat asupra: (1) diagnosticului, manifestărilor extrarenale posibile, prognosticului (caracterul cronic şi progresiv al bolii, posibilele complicaţii, evoluţia spre IRC T, opţiunile de supleere a funcţiei renale – dializa şi transplantul); (2) naturii genetice a bolii (AD) şi riscului de 50% de a o transmite la descendenţi; (3) utilităţii unei evaluări angiografice impuse de agregarea familială a anevrismelor intracraniene în ADPKD.

Pacientul este sfătuit şi încurajat să-şi informeze *familia – sora şi cei trei copii – despre: riscul teoretic de 50% de a primi şi transmite gena mutantă; posibilitatea şi importanţa* screening*-ului familial şi a diagnosticului presimptomatic. Pacientul este de acord şi solicită sprijinul medicului genetician în această acţiune.*

Rudele de gradul I ale pacientului au fost apoi informate despre: boală şi natura ei genetică, utilitatea şi modalităţile diagnosticului presimptomatic (imagistic şi molecular), consecinţele depistării bolii în stadiu asimptomatic şi riscul genetic de a transmite gena anormală (dacă o au) la copii. Cu consimţământul lor informat se trece la realizarea unui screening *familial, fiind examinaţi ecografic, iniţial, sora pacientului şi fata mai mare.*

Sora pacientului (35 de ani) nu prezintă chisturi renale sau hepatice şi nici o manifestare clinică extrarenală; are două fetiţe de 9 şi 5 ani, care nu au fost evaluate. Teoretic, la 35 de ani este încă posibil ca boala să nu se manifeste morfologic şi clinic sau chisturile să fie sub limita de rezoluţie a ecografului; persoana va fi urmărită în continuare ecografic sau, mai bine, prin tomografie computerizată. În eventualitatea în care s-ar pune problema donării unui rinichi fratelui bolnav se va face obligatoriu testare genetică.

La fiica mai mare a pacientului (30 de ani), aparent sănătoasă, examenul ecografic a evidenţiat chisturile multiple, bilaterale, de dimensiuni mici; deci ea prezintă, pentru moment, o formă asimptomatică de *ADPKD, dar în următorii ani boala va deveni manifestă clinic. Pacienta are o fetiţă de 2 ani şi la momentul evaluării era gravidă în luna treia. Pentru sarcina în curs de evoluţie, mama are un risc de 50% de a transmite gena mutantă la făt. S-a pus problema diagnosticului prenatal, dar cum deocamdată testarea genetică nu este posibilă în ţară, cuplul a dorit iniţial întreruperea sarcinii, dar, în final, după câteva discuţii, a renunţat la această opţiune, deoarece a reţinut că boala se manifestă de obicei tardiv în cursul vieţii şi este posibil ca în timp să se descopere o terapie de blocare a evoluţiei chisturilor.*

*Băiatul pacientului a fost iniţial de acord cu evaluarea, dar ulterior a avut ezitări şi, în final, când a aflat că sora sa mai mare are ADPKD, a refuzat testarea. Este „*dreptul său de a nu şti*". Se recomandă să-şi informeze medicul de familie despre contextul familial al bolii şi să-şi controleze bianual TA.*

La fiica mai mică (12 ani), precum şi la ceilalţi copii din familie, părinţii au solicitat evaluarea ecografică, considerând că au dreptul „de a şti" care este statusul genetic al copiilor. Explicaţiile medicului genetician, care a invocat dreptul de decizie al copiilor la vârsta maturităţii, au fost convingătoare şi toate persoanele cu risc genetic crescut vor fi atent monitorizate în viitor. Din prezentarea acestei familii cu ADPKD, în care se regăsesc majoritatea problemelor etice ale testării genetice menţionate în text, rezultă destul de evident complexitatea sfatului şi testării genetice şi responsabilitatea ce revine medicului.

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITAR IBRARY

- *Comunicarea şi explicarea rezultatelor.* Rezultatele testelor, inclusiv rezultatele normale, vor trebui comunicate persoanei testate fără nici o întârziere[1]. Medicul va explica pacientului – dar numai dacă acesta doreşte acest lucru – *semnificaţia rezultatelor* obţinute pentru sănătatea lui şi/sau a copiilor lui, *consecinţele* lor şi *alternativele* de care dispune pacientul. Trebuie să subliniem că pacientul are şi *„dreptul de a nu şti"*, de a nu cunoaşte rezultatele testărilor; atunci când exprimă această dorinţă, ea trebuie respectată (exceptând testele nou-născuţilor sau ale copiilor pentru afecţiuni tratabile). Medicul nu este obligat să informeze pacientul asupra unor informaţii/rezultate (de exemplu, non-paternitatea, sursa defectului) atunci când acestea *nu* au implicaţii asupra sănătăţii pacientului sau descendenţilor săi şi ar putea genera situaţii neplăcute.
- *Accesul la informaţie.* Pe baza principiului *confidenţialităţii*, accesul unei terţe persoane la rezultatele pacientului este interzis fără acordul expres al pacientului. Acest lucru este valabil şi pentru partenerul de cuplu. Respectarea confidenţialităţii implică măsuri administrative şi legislative pentru ca informaţia genetică să nu poată fi accesată de către angajatori sau asiguratori în defavoarea pacientului. O situaţie delicată apare atunci când datele despre informaţia genetică a pacientului pot fi utile în evaluarea rudelor sale cu risc; în acest caz, pacientul va fi încurajat să transmită singur aceste date sau să dea medicului acordul său. Dacă pacientul nu va face acest lucru, confidenţialitatea poate fi eludată în favoarea beneficiului (vezi „autonomie/confidenţialitate *versus* beneficiu"), dar numai în situaţiile când există o înaltă probabilitate de afectare ireversibilă sau/şi fatală a rudelor în lipsa acestei dezvăluiri.
- *Păstrarea/stocarea probelor/inclusiv a ADN* poate aduce beneficii pentru pacient (atunci când se vor introduce noi metode de analiză) sau pentru familia sa (pentru diagnosticul genetic la rudele prezente sau viitoare – diagnostic prenatal). *Accesul la* probe va fi reglementat însă foarte clar, fiind interzis unor persoane străine sau instituţii fără acordul bolnavului, excepţie făcând cazurile medico-legale. O situaţie specială o reprezintă folosirea probelor/rezultatelor în diferite proiecte de cercetare; după explicaţii adecvate, se va cere un acord de principiu „în alb" pentru accesul cercetătorilor, dar numai după îndepărtarea semnelor de identificare a persoanei.

2.2. Diagnosticul prenatal

Diagnosticul prenatal (DPN) este un act medical complex, înalt informativ, al cărui obiectiv este diagnosticarea unui *fetus cu o afecţiune gravă* şi furnizarea de *informaţii privind sănătatea fetusului* către părinţi şi medici. DPN oferă o *valoroasă opţiune reproductivă* cuplurilor cu risc crescut: ele vor putea concepe o sarcină ştiind că prezenţa sau absenţa bolii la fetus poate fi confirmată prin testare; astfel, pot *evita naşterea* unui copil cu o afecţiune genetică sau malformativă serioasă (vezi capitolul 19). Toate aceste elemente subliniază pregnant ideea că *DPN se face exclusiv în scopuri medicale şi pe criterii bine stabilite.*

DPN ridică numeroase şi uneori dificile probleme medicale şi bioetice ceea ce implică o cunoaştere şi respectare *obligatorie* a *principiilor cardinale ale bioeticii.*

Serviciile de *screening* şi diagnostic prenatal trebuie să fie organizate şi să funcţioneze la cei mai înalţi parametri tehnici pentru a garanta siguranţa şi calitatea procedurii. Să nu uităm că obţinerea de celule fetale pentru analize se face prin manevre invazive, care au un risc de 1-3% de avort; eşecurile tehnice sau rezultatele dubioase nu se pot compensa printr-o nouă prelevare şi analiză (DPN este un fel de „cursă contra cronometru").

În aceste condiţii particulare, pentru a se respecta principiul bioetic *non-vătămarea şi beneficiul*, serviciile de DPN trebuie să fie autorizate (acreditate) pe baza unor criterii ferme, personalul lor calificat să aibă o competenţă confirmată, procedurile să se realizeze pe baza unor protocoale obligatorii, aprobate de experţi şi să existe un permanent control de calitate a procedurilor şi a performanţelor. Serviciile DPN trebuie să aibă resurse adecvate şi să respecte un alt principiu bioetic, *dreptatea şi echitatea* – deci accesul egal la servicii medicale şi tratarea egală şi corectă a solicitanţilor.

De multe ori însă, resursele (umane şi tehnice) sunt limitate şi/sau inegal distribuite, iar acest lucru generează un conflict etic: *autonomia cuplului* versus *respectul echităţii.* În condiţiile unor resurse limitate, potrivit OMS, au prioritate cuplurile „cu nevoi mai mari", deci cu indicaţii medicale certe şi în primul rând cele cu risc genetic crescut. În absenţa unei indicaţii medicale certe (de exemplu, anxietatea mamei), DPN va avea o prioritate redusă. În plus, respectul echităţii însuşi poate intra în conflict cu resursele. *Conflictul între echitate şi posibilităţi* ar putea fi

1. Informaţia care ar putea cauza afectări grave psihologice sau sociale poate fi temporar reţinută; consilierul trebuie să hotărască când persoana testată este pregătită să primească informaţia.

amplificat de *adresabilitatea inegală* a cuplurilor, determinată de o informare şi educaţie sanitară deficitare sau de dificultăţile financiare ale familiei.

Un alt conflict etic, ce poate deveni acut, este *autonomia cuplului versus non-vătămare/beneficiu* fetal. El apare în cazul *solicitării DPN pentru motive non-medicale* (de exemplu, selecţia sexului fetal, determinarea paternităţii). Conform normelor internaţionale actuale de bioetică – care restricţionează DPN exclusiv în scopuri medicale –, aceste solicitări nu sunt acceptate[2], pentru a evita orice risc de derivă eugenică, dar această atitudine, logică în opinia noastră, intră în contradicţie cu principiul autonomiei, al dreptului cuplului de a lua singur decizii reproductive.

Principiul autonomiei deciziei pacientului de a participa la DPN implică pentru medic responsabilitatea de a asigura înainte de testare (oral şi scris) toate informaţiile necesare asupra procedurii, pentru ca pacientul să poată face *o opţiune informată* şi să poată lua *o decizie informată* privind participarea la test, fie dându-şi consimţământul, fie refuzând; după efectuarea testului, procesul de consiliere continuă pentru ca pacientul să facă o opţiune informată privind consecinţele testării.

Consilierea pretestare este absolut necesară şi trebuie realizată de personal calificat (de regulă, *medici geneticieni*) şi trebuie să fie completă şi corectă (nondirecţională). Ea va cuprinde:

- *sfatul genetic*, care stabileşte *riscul* ca fetusul să fie afectat (acesta trebuie exprimat în diferite moduri – procentaj, proporţie etc. – pentru a fi corect perceput), precum şi şansele unui fetus normal;
- *enumerarea bolilor ce pot fi diagnosticate* prin diferite metode de DPN precizând: caracteristicile clinice, consecinţele asupra fetusului şi evoluţia postnatală (severitatea), posibilităţile de tratament prenatal (dacă există) şi/sau de tratament postnatal, sursele de *sprijin* în îngrijirea copilului;
- *prezentarea alternativelor de testare* şi consecinţele lor (ecografie fetală, biopsie de vilozităţi coriale, amniocenteză, cordocenteză), inclusiv dreptul de a nu face testele;
- *date despre testul acceptat*: calităţile, riscurile (pentru fetus şi mamă) şi limitele sale, şansa unui diagnostic cert, posibilitatea unor rezultate (ecografice şi de laborator) ambigue; posibilitatea unor rezultate neaşteptate (altă boală/anomalie; paternitate);
- *opţiunile* după diagnosticarea unui făt afectat;
- costuri, rambursări.

Informarea posttestare

- Comunicarea rezultatelor obţinute se va face fără întârziere, într-o *manieră nondirecţională* (imparţială). În peste 95% din cazuri, rezultatele DPN sunt normale şi copilul va fi sănătos, fapt care constituie *principalul avantaj al DPN* (eliminarea incertitudinii şi reducerea anxietăţii). În circa 5% din cazuri, *fetusul va fi afectat*. În această situaţie, cuplul va fi complet şi corect informat asupra:
  - manifestărilor şi severităţii bolii (subliniindu-se posibilitatea penetranţei şi expresivităţii variabile), posibilităţile de tratament/recuperare;
  - alternativele posibile: (1) păstrarea sarcinii, naşterea şi creşterea în familie sau într-o instituţie specială; (2) întreruperea sarcinii. *Alegerea* făcută de mamă sau cuplu cu privire la un făt afectat va trebui *respectată şi protejată*.
- *Accesul la informaţie sau la probele* pacientului (celule, ADN) a unor terţe persoane se va face numai cu avizul pacientului (pentru respectarea confidenţialităţii şi păstrarea intimităţii). Medicul va insista ca atunci când *informaţia este utilă pentru sănătatea altor membri* din familie pacientul să o transmită personal.

Dileme şi controverse etice privind diagnosticul prenatal

(1) *Întreruperea sarcinii cu un fetus afectat* este discutabilă ca procedură. Cei care sunt pentru consideră că întreruperea sarcinii este *un „rău" mai mic* decât o viaţă de suferinţă; cei care sunt contra susţin dreptul fetusului la viaţă (în opinia lor, DPN ar fi o opţiune de tipul *„to kill or not to kill"* şi ar altera semnificativ statutul persoanelor cu nevoi speciale).

(2) *Autonomia cuplului* versus *beneficiul fetusului.* În cazul unor afectări fetale medii (de exemplu, despicături labio-palatine) sau uşoare (de exemplu, polidactilie), eventual tratabile după naştere, decizia cuplului de a întrerupe sarcina va trebui respectată pe baza principiului *autonomiei.* Opiniile contrare se bazează pe argumentul că, prin definiţie, „DPN se face exclusiv în scopuri medicale, pentru a evita naşterea unui copil cu o afecţiune genetică sau malformativă *gravă/serioasă*". Contraargumentele la această poziţie susţin că termenii de „boală gravă/serioasă" nu sunt definiţi clar şi atunci se pot pune firesc întrebările: care este pragul de severitate, limita de demarcaţie dintre grav şi mai puţin grav? Cine va stabili acest lucru? La aceste întrebări nu există încă răspunsuri clare.

2. *Excepţiile* permise sunt selecţia sexului pentru unele boli grave recesive legate de X (ce nu pot fi diagnosticate prenatal) sau determinarea paternităţii, în caz de viol/incest.

BCU "VICTOR BABEŞ" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(3) *Autonomie* versus *paternalism* este un conflict între autonomia pacientului (dreptul de a decide) şi atitudinea paternalistă – directivă – a unor medici care recomandă un anumit curs al acţiunii, considerându-l mai bun. Chiar dacă această abordare poate fi „benignă şi bine intenţionată", conduita standard în genetica medicală este *sfatul nondirectiv şi imparţial*, fără prejudecăţi.

(4) *Confidenţialitate* versus *beneficiu familial.* Conflictul apare atunci când pacientul refuză să transmită altor membri cu risc ai familiei rezultatele testelor sale, rezultate ce sunt utile pentru evaluarea sănătăţii acestora. În acest caz, comisiile internaţionale de bioetică agreează ideea că *geneticianul poate contacta rudele pacientului* prin intermediul medicului de familie şi le poate transmite aceste date.

(5) *DPN este o formă de eugenie individuală* („*home eugenics*"). DPN este o formă nouă, mascată, de *eugenie negativă* deoarece: permite *excluderea* fetuşilor cu handicap genetic sau malformativ, influenţând structura genetică prezentă şi viitoare a populaţiei; dă omului puterea *de a decide ceea ce este uman* şi de *a tria* în consecinţă. Contraargumentele pentru caracterul non eugenic al DPN sunt:

- termenul de eugenie se referă la implicarea *coercitivă* a statului în reproducerea umană;
- autonomia reproductivă nu este eugenie, ci *o formă superioară a drepturilor omului*: non-ingerinţa societăţii în deciziile reproductive ale cuplului;
- modificarea patrimoniului genetic este *consecinţa neintenţionată* a alegerii individuale parentale;
- *efectele disgenice ale DPN* (reduce frecvenţa genelor dominante, a bolnavilor cu afecţiuni recesive şi boli cromozomiale, dar creşte frecvenţa heterozigoţilor recesivi) sunt *mici şi temporare* (creşterea frecvenţei heterozigoţilor va creşte din nou frecvenţa bolnavilor homozigoţi).

2.3. *Diagnosticul genetic preimplantator*

Diagnosticul preimplanator (DGP) permite *selecţia embrionilor* cu genotip normal înaintea implantării în uterul unei femei pregătită pentru sarcină. DGP este folosit pentru evitarea unor boli monogenice grave prezente în familie (DGP) sau *screening*-ul unor aneuploidii (SGP). Embrionii sunt concepuţi prin fertilizate *in vitro* şi în stadiul de 6-10 celule se recoltează 1-2 celule, care sunt analizate genetic (molecular prin PCR, citogenetic prin FISH, CGH array); 1-3 embrioni genetic normali sunt replantaţi în uter.

Deoarece implică crearea şi distrugerea unor embrioni principala problemă etică a DGP este *statutul moral al embrionului.* În această problemă complexă se confruntă partizanii ideii că embrionul este din momentul fertilizării o fiinţă umană care are un statut moral deplin ce face inacceptabilă distrugerea sa cu cei care susţin că embrionul obţine acest statut în mod gradual în cursul dezvoltării. În practică această problemă, care nu are încă soluţii, pare a fi echilibrată cel puţin de alte valori, cum ar fi prevenirea unei boli grave. În aceste condiţii dilema etică este *selecţia* embrionilor pe baza anumitor caracteristici. Evitarea unei boli genetice grave şi dreptul părinţilor de a avea un copil sănătos reprezintă premisa benefică a acestei acţiuni considerată „necesitate medicală". Se consideră astfel că principala/singura indicaţie medicală a DGP este prevenirea naşterii unui copil afectat de o boală genetică gravă.

Tehnica ar putea fi însă utilizată pentru alte situaţii considerate ne etice: selecţia sexului embrionului, selecţia unui embrion neafectat cu un anumit haplotip HLA (în vederea folosirii „*copilului salvator*" ca posibil donator pentru un alt copil afectat) sau pe baza altor criterii (de exemplu, prezenţa sau absenţa unor gene ce ar putea codifica anumite caracter mai speciale, deci un fel de „*copil proiectat*").

DGP „încalcă" însă şi alte principii etice. Costurile metodei sunt ridicate neacoperite de asigurările medicale şi deci procedura este accesibilă doar unui grup restrâns de familii, creând din start *inechitate şi injustiţie.* Este implicat şi principiul *beneficiului şi non-vătămării.* Formulând un rezultat pe baza analizei unei singure celule, DGP se bazează pe prezumţia că această celulă este reprezentativă pentru restul embrionului. Acest lucru poate să nu fie corect ţinând cont de gradul ridicat de mozaicism în primele faze ale dezvoltării embrionare. În plus, DGP poate da rezultate fals negative ducând la acceptarea unui embrion anormal sau fals pozitive ducând la eliminarea unui embrion normal. În final menţionăm că selecţia unui embrion normal „susţine" discriminarea faţă de cei cu dizabilităţi.

2.4. *Testarea presimptomatică şi testarea predictivă*

Tehnicile actuale de diagnostic permit testarea presimptomatică sau predictivă pentru unele boli ce debutează clinic la vârsta adultă: boala Huntington, hipercolesterolemia familială, ADPKD, polipoza adenomatoasă familială, unele cancere ereditare ş.a. Acest tip de testare ridică probleme şi dileme etice ce vizează în special autonomia individului şi beneficiul.

a) Testarea presimptomatică

În unele boli autozomal dominante cu debut tardiv, testarea presimptomatică imagistică (de exemplu, CT

sau RMN în cazul ADPKD), biochimică (de exemplu, bilanţul lipidic în hipercolesterolemia familială sau alte dislipidemii ereditare) şi/sau moleculară (de exemplu, în boala Huntington) poate pune un diagnostic înaintea instalării manifestărilor clinice. Consecinţele unui rezultat pozitiv depind de posibilităţile actuale de tratare a bolii sau ale complicaţiilor ei, ameliorând evoluţia clinică a pacientului; cert este că diagnosticul presimptomatic determină o schimbare profundă în stilul de viaţă şi poate produce puternice traume psihologice şi/sau drame socio-familiale. În schimb, un rezultat negativ la o persoană cu risc de 50% de a moşteni mutaţia aduce bucurie şi linişte. Pentru familie, cunoaşterea statusului genetic al persoanei cu risc poate fi importantă în planificarea familială.

În toate aceste cazuri se pune problema dacă testarea este, în general, mai benefică decât prejudiciul psihologic posibil la care se poate adăuga riscul stigmatizării sau al discriminării (la angajare, asigurări de viaţă sau medicale). Oricum, se va respecta cu strictețe principiul autonomiei şi respectului confidenţialităţii, asigurând pacientului înaintea testării informaţii complete, corecte şi imparţiale (nondirective) pe baza cărora acesta va lua singur o decizie informată. Dacă pacientul acceptă testarea, orice rezultat pozitiv va fi însoţit de un program special de consiliere şi sprijin, în concordanţă cu gravitatea bolii. Rezultatele testelor vor fi confidenţiale şi nici o terţă persoană nu va avea acces la ele fără acordul pacientului.

b) Testarea predispoziţiei la boală

Acest tip de testare, numit şi *predictivă*, se adresează în special rudelor sănătoase, de gradul I sau II, ale unui pacient afectat de o boală comună cu predispoziţie genetică, inclusiv unele forme de cancer ereditar sau familial (vezi capitolul 18) – pentru care există teste care permit punerea în evidenţă a genelor de predispoziţie.

Testarea susceptibilităţii genetice a unei persoane cu antecedente familiale pentru boli comune cu posibilă predispoziţie genetică ar trebui să fie încurajată, cu condiţia ca informaţia dată de teste să fie folosită exclusiv pentru prevenţia sau tratamentul bolii (*beneficiul*). Toate testele de susceptibilitate trebuie să fie voluntare, precedate de o informare corectă şi pe baza consimţământului informat (*autonomia*).

În informarea pretestare se va insista în mod deosebit pe faptul că *mutaţiile predispozante nu produc inevitabil boala*. De exemplu, purtătorii unor mutaţii ale genelor BRCA1 sau BRCA2 implicate în cancerele de sân ereditare au un risc de 50-90% de a face un cancer de sân sau de ovar. Beneficiul identificării purtătorilor de mutaţie constă în supravegherea atentă şi frecventă pentru a depista precoce o tumoră – or, nu se poate aprecia dacă acest beneficiu este mai mare decât „vătămarea" psihologică produsă de un rezultat pozitiv.

c) Testarea genetică la copii

Testarea predictivă a copiilor cu risc de a moşteni o mutaţie ce se manifestă clinic la adult ridică delicate probleme etice şi psihologice. Părinţii pot cere stabilirea statusului genetic al copilului, considerând că acest lucru ar putea fi benefic pentru controlul evoluţiei bolii, reducerea morbidităţii, creşterea longevităţii şi/sau pentru orientarea lui educaţională. Refuzul acestei solicitări ar putea fi considerat ca *o contestare a drepturilor de părinţi* (autonomiei parentale), inclusiv a datoriei lor de a informa şi pregăti copilul pentru posibilitatea dezvoltării unei boli severe. Acceptarea testării vine însă în contradicţie cu *autonomia viitoare a copilului* şi, în situaţia unui test pozitiv, are riscul unei afectări psihologice, stigmatizare sau discriminare (non-beneficiu şi vătămare).

Testarea copiilor duce inevitabil la încălcarea confidenţialităţii şi a caracterului privat al informaţiei genetice, poate ignora statutul moral particular al copilului şi diminua autonomia copilului. Ea ar putea produce consecinţe devastatoare, de ordin (psiho)social, emoţional, educaţional asupra minorilor. Testarea copiilor poate ignora dreptul de *„a nu şti"* şi integrarea copiilor în procesul de luare a deciziilor.

Bioeticienii consideră – pe baza respectului autonomiei individuale (autodeterminării) – că *testarea precoce a copilului trebuie amânată* până la vârsta la care adolescentul este suficient de matur pentru a lua singur o decizie informată (oricum înainte de a-şi constitui o familie). Totuşi, testarea copiilor va fi acceptată – pe baza principiilor non-vătămării şi beneficiului – *numai* în situaţiile în care o intervenţie medicală precoce este utilă şi le aduce un beneficiu direct şi clar (precum în hipercolesterolemia familială sau în unele forme de cancer ereditar, cum este neoplazia endocrină multiplă tip 2).

Recomandările cu privire la testarea minorilor

În evaluarea etică a testării genetice a minorilor trebuie făcută distincţia între beneficiu medical şi beneficiu non-medical (psihosocial: diminuarea sau clarificarea unei incertitudini, abilitate sporită de a planifica viitorul) şi evaluarea dezavantajelor testării (tabel 21.1). Majoritatea recomandărilor etice avansează ideea potrivit căreia beneficiul medical trebuie să fie principala justificare pentru testarea minorilor pentru boli cu debut tardiv şi/sau precoce este existenţa unui beneficiu medical. În acest sens majoritatea societăţilor de genetică umană indică ferm ca testarea genetică să se facă de preferinţă la vârsta de acordare legală a consimţământului, iar daca acest lucru nu este posibil, atunci ea se va face doar când un tratament

Tabel 21.1. Beneficiile potențiale și dezavantajele testării genetice la copii
(după ASHG/ACMG Report, 1996)

Categorie	Beneficii	Dezavantaje
Probleme medicale	Intervenții preventive sau terapeutice precoce și eficace	Intervenții preventive sau terapeutice ineficace sau dăunătoare
	Supraveghere sporită	
	Evitarea supravegherii ne necesare	
	Clarificarea diagnosticului	
	Ameliorarea prognosticului	
Probleme psihosociale	Reducerea incertitudinii	Alterarea imaginii de sine
	Reducerea anxietății	Distorsiunea percepției parentale a copilului
	Oportunitate pentru măsuri psihosociale	Creșterea anxietății și vinovăției
	Posibilitatea de a face planuri realiste de educare, profesie, asigurare și relații interpersonale	Alterarea perspectivelor pentru educație, profesie și relații interpersonale
	Alertarea altor membri ai familiei cu risc genetic	Identificarea altor membri ai familiei cu risc de boală cu debut tardiv
		Discriminare la angajare sau asigurări
Probleme reproductive	Evitarea nașterii unui copil cu boală genetică	Decizii coercitive
	Pregătire pentru nașterea unui copil cu boală genetică	
	Decizii informate de planificare familială pentru părinți	

eficient sau intervenții medicale clare pot fi oferite (dietă, medicație, urmărirea complicațiilor).

Situația este mai puțin clară în cazul bolilor cu debut în timpul copilăriei, pentru care pot exista măsuri de terapie sau prevenție. Aici se lasă la latitudinea părinților în a determina „interesul maxim al copiilor". Deci, existența unui beneficiu medical este cea mai important justificare pentru realizarea testării genetice predictive sau presimptomatice la copii, indiferent de debutul bolii. Absența unui beneficiu medical (în condițiile existenței unui beneficiu de ordin psihosocial) constituie rațiunea pentru amânarea testării până când tânărul adult va fi capabil să ia o decizie informată (după o discuție amănunțită și o explorare atentă a problemei).

Obiecții aduse testării genetice la copil

- Testarea minorilor (chiar adolescenți) îndepărtează/elimină dreptul lor de a lua aceeași decizie informată pe care ar lua-o un adult autonom.
- La testarea copiilor, confidențialitatea este încălcată, din moment ce părinții vor fi informați asupra rezultatelor testelor.
- Părinții și-ar putea altera așteptările lor de la un copil care primește un rezultat genetic pozitiv.
- Poate apare o distrugere/alterare/modificare a relației părinte – copil, mai ales dacă părinții dezvoltă sentimente de anxietate sau vinovăție.
- Adolescenții se pot auto-blama pentru un rezultat genetic pozitiv și îl pot percepe ca pe o „pedeapsă".
- Adolescenții pot înțelege greșit informația genetică ce li se prezintă.
- Dacă unul din descendenți primește o informație asupra statutului său genetic, alți descendenți și-ar putea atribui în mod eronat un risc mai mare/mai mic decât cel cunoscut.
- Copiii își pot altera stima de sine, identificându-se drept purtător al unei gene mutante, dezvoltând sentimente de inutilitate și imposibilitatea de a se mai căsători.
- Copiii cu teste genetice pozitive pot avea dificultăți mai mari decât adulții în a obține asigurări de viață.

Argumente în sprijinul testării genetice a minorilor

- Cunoașterea statutului genetic poate ajuta tinerii să își planifice viitorul.
- Testarea poate contribui la definirea identității de sine a adolescentului, văzut drept un participant activ în deciziile de viață, și nu o victimă a genelor sale, ajutând astfel la promovarea autonomiei tânărului.
- A refuza testarea poate produce o vătămare psihologică.
- Cunoașterea precoce a statutului genetic poate ajuta părinții să își pregătească copiii în acest sens.
- Părinții sunt cei care suportă responsabilitatea primară pentru copiii lor, ca urmare ar trebui să li se acorde dreptul de a lua decizia asupra testării propriilor copii.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Testarea precoce permite ca statutul genetic să fie încorporat în identitatea copilului, pentru a-l pregăti din punct de vedere psihologic.
- Testarea facilitează deschiderea, în cadrul familiei.

2.5. Folosirea informației genetice obținută prin testare

Genomica a contribuit foarte mult la înțelegerea mecanismelor moleculare ale bolilor, introducerea unor noi teste genetice pentru diagnosticul bolilor sau predispoziției la boli și inițierea unor intervenții eficace. În acest context se fac eforturi pentru a anticipa, înțelege și aborda implicațiile etice, legale și sociale ale genomicii.

Problema esențială este *folosirea corespunzătoare a informației genetice*, numai pentru îngrijirile medicale și în interesul pacientului.

În acest context, termenul de „informație genetică" semnifică informațiile obținute prin teste genetice efectuate la o persoană sau la alți membri ai familiei sale. Un „test genetic" este o analiză a ADN, ARN, cromozomilor, proteinelor sau metaboliților efectuată pentru identificarea unei mutații genice sau anomalii cromozomiale.

Determinarea informației genetice generează două temeri majore: folosirea discriminatorie a informației genomice și schimbarea naturii relației medic-pacient.

- În țările în care progresele geneticii și genomicii sunt larg mediatizate spre informarea publicului larg se constată două fenomene. Pe de o parte „frica de genetică", iar pe de altă parte frica folosirii discriminatorii a informațiilor genomice.
  - Publicul crede că informația genetică este predictivă și definitivă, determinismul genetic fiind un fel de destin inevitabil deoarece „nu putem schimba genele". Ori, în realitate caracterele umane, normale sau patologice, sunt produsul interacțiunii complexe în timp dintre gene și mediu, iar multe boli genetice pot fi prevenite și tratate. De aceea o cale de a calma frica de genetică este furnizarea unei perspective realiste despre puterea informativă a tehnicilor genomice.
  - Mulți se tem însă că informațiile genomice ar putea fi folosite discriminatoriu, influențând negativ spre exemplu accesul la asigurările medicale, angajare, educație și chiar împrumuturi bancare. Se discută cine ar trebui să aibă acces la aceste informații și în ce condiții; se recunoaște că limitarea accesului la documentele medicale ale pacientului nu este posibilă.
- Tehnicile folosite în medicina genomică permit obținerea de informații despre riscurile medicale ale pacientului, dar și a rudelor sale. În ultima situație se pune problema dacă medicul are dreptul să contacteze aceste persoane contravenind normelor tradiționale centrate pe pacient care impun respectul confidențialității. Dar, în medicină, obligația protejării confidențialității nu este absolută, existând excepții (de exemplu, medicii sunt obligați să raporteze numeroase boli infecțioase). Deoarece riscurile genetice nu sunt similare cu cele care permit excepțiile, opinia generală a bioeticienilor este că *medicii trebuie să respecte confidențialitatea*, având însă obligația de a informa pacientul despre riscul rudelor sale, despre oportunitatea de a transmite el însăși această informație și eventual de ai oferi asistență în acest proces. Dacă pacientul refuză transmiterea informațiilor medicul trebuie să respecte această decizie, singura excepție posibilă fiind poate situația unei boli severe.

Legile antidiscriminatorii trebuie să creeze premizele unei societăți în care persoanele vor fi incluse și respectate indiferent de rasă, sex sau dizabilități. În acest context ar trebui să funcționeze și o lege a folosirii nediscriminatorii a informației genetice[3]. În 2008, Senatul SUA a adoptat *„The genetic Information Nondiscriminatory Act (GINA)* care interzice discriminarea bazată pe informația genetică, în special în asigurările medicale și la angajări în servicii.

3. *Screening*-ul populațional și familial

Obiectivul general al *screening*-ului populațional constă în recunoașterea precoce a unei boli sau a unui genotip anormal pentru ca, printr-o intervenție precoce adecvată, procesele patogenice să poată fi prevenite sau persoanele implicate să poată lua o decizie reproductivă informată. În funcție de populația-țintă se pot deosebi mai multe categorii operaționale de *screening* populațional cu obiective specifice diferite (vezi capitolul 19): *screening*-ul prenatal, *screening*-ul neonatal și *screening*-ul purtătorilor sănătoși ai unei mutații pentru o anumită boală monogenică.

Problemele și dilemele etice cu care se confruntă *screening*-ul populațional privesc programul, serviciile, participarea și efectuarea *screening*-ului.

Programul trebuie oferit în mod corect și echitabil unui număr cât mai mare de persoane de către

3. Societatea Europeană de Genetică Umană a formulat, prin comisiile de experți, încă din 2003, Recomandări privind problemele tehnice, sociale și etice privind testarea genetică și folosirea non-discriminatorie a informației genetice.

organisme guvernamentale sau nonguvernamentale autorizate, pe baza unor tehnici standardizate şi a unui serios control de calitate. Participarea persoanelor la *screening* trebuie să fie *voluntară*, bazată pe o informare completă şi uşor de înţeles, care să permită un consimţământ informat. Principiul genetic *dreptate şi echitate* presupune accesul egal la servicii medicale şi abordarea egală şi corectă a participanţilor. Resursele (umane şi tehnice) limitate, distribuţia inegală a serviciilor şi resurselor sau adresabilitatea inegală a pacienţilor (determinată de o informare şi educaţie medicală deficitară sau de dificultăţile financiare ale familiei) împiedică efectuarea *screening*-ului întregii populaţii-ţintă şi fac ca aceste principii să nu poată fi adeseori respectate. Dilema etică principală este următoarea: *în cazul unor resurse limitate cine va avea prioritate*? În aceste cazuri, OMS recomandă ca prioritate să aibă cei cu nevoi mai mari (înţelegând prin aceasta posibilităţi reduse sau risc genetic crescut).

Serviciile de screening trebuie să îndeplinească standardele tehnice de calitate pentru a garanta siguranţa şi calitatea procedurii şi a reduce la maximum posibil rezultatele ambigue, fals pozitive sau fals negative, în contradicţie cu principiul bioetic al *non-vătămării*.

Participarea persoanelor la procedura de testare trebuie să fie *voluntară*, în conformitate cu *principiul respectului autonomiei*, ceea ce implică:

- pentru pacient – dreptul de a fi informat, de a decide singur, fără nici o constrângere, participarea la *screening* şi diagnosticul prenatal;
- pentru medic – responsabilitatea de a asigura înainte de testare (oral şi scris) toate informaţiile necesare asupra procedurii, pentru ca pacientul să poată lua o *decizie informată* privind participarea la test, fie dându-şi consimţământul, fie refuzând; după efectuarea testului procesul de consiliere continuă pentru ca pacientul să facă *o opţiune informată* privind consecinţele testării.

Informaţiile ce preced testul vor fi complete şi corecte; ele trebuie să cuprindă obligatoriu:
- scopul, beneficiile şi riscurile testării;
- şansele unei predicţii complete (posibilitatea unor rezultate ambigue, fals negative sau fals pozitive);
- faptul că orice test pozitiv va trebui confirmat prin alte metode;
- confidenţialitatea informaţiilor şi asigurarea că acestea nu vor fi dezvăluite unor terţe persoane fără acordul pacientului.

Este esenţial să se înţeleagă că *testul screening nu realizează un diagnostic cert*, ci numai o apreciere a riscului.

Informarea după testare:
- rezultatele pozitive trebuie transmise imediat de către o persoană care cunoaşte bine problemele legate de *screening* şi să explice – într-o manieră tonică, relaxantă şi plină de înţelegere – *consecinţele* testului pozitiv, inclusiv faptul că pacientul poate fi totuşi normal (5% rezultate fals pozitive);
- rezultatele negative se pot comunica prin telefon cu menţiunea că *nu exclud* complet posibilitatea ca subiectul să fie afectat (10% rezultate fals negative).

În screening-*ul neonatal*, pentru a reduce rata nedepistării unor cazuri de boală, este necesar un nivel înalt de participare la *screening*; în unele ţări/regiuni participarea la *screening* este obligatorie, dar cele mai multe programe se bazează pe *includerea voluntară* a mamelor în testare. Deseori se alege varianta „*opt-out*": gravidele sunt informate prenatal despre test şi dacă nu-şi exprimă dezacordul sunt incluse automat în testare, fără a li se mai cere alt consimţământ. Desigur, din punct de vedere etic, varianta „*opt-in*" este cea mai corectă deoarece se solicită un consimţământ informat, activ, înainte de efectuarea testului.

Problema etică esenţială ce apare în *screening*-ul populaţional este posibilitatea compromiterii *autonomiei de decizie a* cuplului (în cazul *screening*-ului prenatal) sau a părinţilor (în cazul *screening*-ului neonatal), fapt determinat de:

- *o informare inadecvată* premergătoare testării (*screening*-ul se adresează unei populaţii mari, şi numărul persoanelor calificate implicate în această activitate este redus);
- *neînţelegerea tuturor aspectelor legate* de test (în special a semnificaţiei *screening*-ului şi/sau a rezultatelor) şi confruntarea cu opţiuni pe care nu le-au luat în considerare înaintea testării; de exemplu, în *screening*-ul matern prenatal cuplurile pot să nu înţeleagă semnificaţia proporţiilor de rezultate fals pozitive (5%) sau fals negative (10-20%) şi astfel pot fi confruntate cu opţiunile diagnosticului prenatal;
- *dificultăţile în înţelegerea informaţiilor posttestare*.

Screening-ul purtătorilor sănătoşi se confruntă cu problema *confidenţialităţii* datelor, mai ales faţă de angajatori sau companiile de asigurări.

Vom sublinia, din nou, că programele de *screening* – populaţional sau familial – ar trebui oferite în mod echitabil întregii populaţii, participarea ar trebui să fie *voluntară*, bazată pe o informare completă şi uşor de înţeles, care să permită un *consimţământ informat*; persoanele vizate *au dreptul de a alege să nu fie testate*.

4. Terapia genică

Terapia genică reprezintă o promisiune valoroasă pentru tratamentul unor boli genetice grave (vezi capitolul 20); deşi se află încă în stadiul experimental, terapia genică suscită deja dezbateri despre posibilele efecte colaterale sau despre tentativele eugenice pe care le poate antrena. Cele mai frecvente referiri s-au făcut

asupra *riscului „devierii"*: acceptarea unor „concesii nevinovate" ar putea duce inevitabil la abuzul unor experimente necontrolate. Pentru a răspunde acestor anxietăți, în țările angajate în experimentare s-au înființat comitete speciale care avizează și controlează toate proiectele de terapie genică.

Trebuie să spunem de la început că *terapia genică germinală* este interzisă pe considerente morale (patrimoniul genetic uman transmisibil este considerat inalienabil), științifice (este impracticabilă, având un randament scăzut) și pragmatice (absența garanției terapeutice și reușitele reale ale diagnosticului prenatal). Nu același lucru se poate spune despre terapia genică somatică care ridică numeroase și ea probleme etice. Ea poate fi utilizată în următoarele condiții:

- obiectivul terapeutic trebuie să fie o boală severă pentru care nu există alternative terapeutice valabile;
- fiecare protocol trebuie să asigure protecția cât mai riguroasă a pacientului (principiul *non-vătămării*) și să fie aprobat de un organism independent, după evaluarea științifică și etică a procedurii;
- participarea pacienților trebuie să se bazeze pe un consimțământ informat, specificând că este vorba de un tratament nou, neverificat, cu efecte terapeutice nedovedite și posibile efecte nocive.

Dilemele etice apar la utilizarea unui protocol la copiii cu afecțiuni grave, care se manifestă precoce, iar o intervenție tardivă este fără efect. Consimțământul părinților în numele copilului este problematic și pot exista presiuni medicale, sociale, familiale, economice asupra acestora.

5. Alte activități de genetică medicală

a) Băncile de ADN

În ultimul deceniu s-a produs o expansiune importantă a colectării și stocării de ADN uman necesară cercetărilor fundamentale, clinice și descoperirii de noi tratamente. Deci probele biologice în general (de exemplu, celule) și de ADN, în special, pot aduce beneficii importante, dar și posibilitatea unor abuzuri și încălcări ale intimității și confidențialității. Aceasta presupune stabilirea și respectarea unor norme de utilizare și de protecție a datelor în orice tip de „depozit" de ADN.

Consimțământul informat voluntar și scris (despre locul, durata stocării, accesul la probe, tipurile de cercetări, managementul și securitatea probelor, asigurarea confidențialității) este absolut necesar pentru toate tipurile de stocare a ADN. În fapt, subiecții devin donatori voluntari de ADN deoarece probele lor de ADN devin proprietatea cercetătorilor. În aceste condiții problema esențială este protecția persoanelor și evitarea accesului neautorizat la folosirea discriminatorie a informațiilor genetice.

b) Bazele de date despre bolnavi

Numărul acestui tip de baze de date privind anumite categorii de boli sau o singură afecțiune este în creștere deoarece permite adunarea de informații despre boli rare și face posibilă rezolvarea unor probleme de patogenie și identificare de ținte terapeutice. În gestionarea lor trebuie să fie verificate: existența unui consimțământ informat inițial al bolnavului, cu aprobarea unui consiliu etic; funcționarea unor mecanisme corespunzătoare de securitate a datelor pentru a proteja caracterul lor privat; folosirea specială a datelor pe anumite direcții etc.

c) Fotografiile medicale

Imaginile unui pacient din documentele medicale sunt folosite frecvent în diferite scopuri: prezentarea unor colegi pentru evaluare dismorfologică și diagnostic, prezentarea la studenți/rezidenți în scop educațional, publicare în reviste medicale ca studii de caz etc. În fiecare caz este absolut necesară protecția pacientului și obținerea unei permisiuni pe baza unui consimțământ informat.

C. Reflecții bioetice asupra omului și umanității

Bioetica este mai mult decât o sumă de principii deoarece determină acțiuni ce tind să dea un sens pozitiv progreselor științei. Ea asigură fundamentarea unor decizii esențiale pentru protecția vieții umane, a corpului uman și a umanității, care să împiedice orice derivă eugenică.

1. Protecția vieții, corpului și speciei umane

În a doua jumătate a secolului XX s-a produs o revoluție în reproducerea umană grație unor tehnici biomedicale: contracepția, fecundarea *in vitro* și procrearea asistată, diagnosticul prenatal și preimplantatoriu. Pentru prima dată în istoria umanității, *omul intervenea direct în procesul reproducerii*. Acest lucru a generat firesc confruntări între diferite concepții – filosofice, religioase, sociale – despre viața umană: dreptul femeii sau al cuplului la procreare (dreptul de a avea un copil) *versus* dreptul la viață al viitorului copil (care atribuie embrionului drepturile unei persoane). În diversitatea opiniilor există totuși un consens: necesitatea de a respecta și proteja viața umană chiar de la începutul ei, fapt ce derivă din „dreptul la viață al oricărui individ" proclamat în Declarația

Universală a Drepturilor Omului la ONU, în 1948 (reluat în constituțiile tuturor țărilor democratice).

Cercetările științifice biomedicale au făcut posibilă utilizarea unor componente umane: sânge, organe, celule. Acest fapt a dus la recunoașterea explicită a *dreptului individului la integritate corporală* și a necesității legislative *a protejării corpului uman.*

Bioetica ridică la cel mai înalt rang posibil conceptul speciei umane, subliniind unitatea sa (în diversitate) și necesitatea protecției integrității speciei umane (indispensabilă în condițiile noilor tehnologii genetice ce fac posibilă „*transformarea omului de către om*"). Din acest principiu decurge o dublă interdicție: prima se referă la orice practică eugenică ce vizează selecția de persoane (mai exact, de embrioni în funcție de sex sau alte caractere), iar cea de-a doua privește transformările aduse caracterelor genetice (mai exact ale celulelor germinale) în scopul modificării descendenței unei persoane.

2. Eugenia[4]

Eugenia a fost la început un cuvânt ce exprima o idee. Termenul „eugenie" a fost introdus în 1883 de către Francis Galton și derivă de la adjectivul grec *eu-genos* ce semnifică „bine-născut". Ideea exprima „orice influență susceptibilă de a *ameliora* calitățile înnăscute ale unei populații și a le dezvolta cât mai bine". Galton se baza pe faptul (eronat în fond) că însușirile specifice omului, în special calitățile sale mentale, sunt ereditare – deși el accepta posibilitatea influențării lor prin educație. Din această perspectivă, ameliorarea populațiilor umane s-ar putea face – în viziunea adepților lui Galton – fie prin creșterea fecundității și încrucișarea celor „mai buni" (eugenie pozitivă), fie prin evitarea degradării patrimoniului genetic al unei populații, reducând fecunditatea sau împiedicând reproducerea celor „inapți" (eugenie negativă). Este iluzoriu să crezi că una sau alta dintre versiuni este mai benignă, ambele fiind condamnabile.

La începutul secolului XX, eugenia devine o ideologie, într-un context științific dominat de teoriile eredității și ale evoluției, precum și într-un context social dominat de inegalități și conflicte. După primul război mondial, eugenia devine o noțiune cu puternice conotații politice, fiind consfințită în mai multe țări – SUA, țările scandinave și Germania – prin legi eugenice bazate pe sterilizarea celor „inapți"; a urmat apoi Holocaustul. Ororile naziste au „întrerupt" evoluția eugeniei clasice, iar criticile serioase și vehemente – bazate pe principii morale, politice, sociale și științifice – au dat „lovitura de grație". Inacceptabilitatea eugeniei se bazează pe următoarele argumente:

- moral/spiritual – indivizii cu dizabilități, fiind creația lui Dumnezeu, merită respectul datorat oricărei ființe umane;
- politic – ideea că oamenii nu sunt egali la naștere este antidemocratică;
- social – este iresponsabil să te interesezi de viitorul „rasei", în loc să ameliorezi starea prezentă a societății;
- științific – nu există, din punct de vedere genetic, rase; inteligența și retardul mental sunt multifactoriale; programele de eradicare a tarelor genetice nu sunt realiste științific.

Uneori însă, termenul „eugenie" căpătă o conotație peiorativă și orice idee sau practică calificată drept „eugenică" pare a fi de la început condamnată. Și totuși sunt suficiente personalități care cred că eugenia a căpătat forme noi în special datorită... geneticii medicale.

O serie de practici biomedicale susținute de genetică au reactualizat temerile unei noi eugenii: fecundarea *in vitro*, diagnosticul preimplantatoriu (și sortarea embrionilor), diagnosticul prenatal și avortul selectiv, prevenirea căsătoriilor între heterozigoți și, de ce nu, selecția gametică și terapia germinală, ambele posibile, dar (pentru moment?!) interzise. Mai mult, ele au fost deja etichetate cu calificativele: eugenie individuală, eugenie domestică („*home eugenics*") sau „noua" eugenie – deoarece, potrivit celor care acordă aceste „calificative", geneticienii își arogă dreptul de a decide ce este uman și acționează în consecință, selectând embrionii. În acest context se pot înscrie și discuțiile despre clonare (vezi subcapitolul 20.A.5, caseta 20.3 și caseta 21.2).

Toți cei care știu ce este și ce face genetica medicală se pot întreba, firesc, *cum este posibilă o astfel de interpretare*? Preocupându-se mai mult de sănătatea individului și a familiei sale și mai puțin de populații, genetica medicală critică deschis eugenia clasică, refuzând orice metode coercitive și bazându-și sfatul genetic nondirectiv pe principiul neutralității consilierului. În sfatul genetic nu este important viitorul populației, ci prosperitatea individului/familiei, iar regula fundamentală este respectul autonomiei de decizie a persoanei/cuplului. În testările genetice și *screening*-ul genetic populațional principiul de bază este noningerința societății în deciziile reproductive ale cuplului. Diagnosticul prenatal (urmat de avortul selectiv) ar putea fi catalogat ca o practică eugenică din punctul de vedere al efectelor disgenice, dar acestea sunt consecința neintenționată a alegerii individuale (femeile nu aleg avortul pentru ameliorarea patrimoniului genetic al speciei). Toate practicile geneticii medicale se bazează pe voluntariat și sunt justificate de grija de a preveni suferința umană; este drept că unele au efecte disgenetice (scăderea numărului de homozigoți, heterozigoți dominanți și de purtători

4. Problema eugeniei este prezentată sintetic după lucrările lui J. Gayon (1992,1998).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de aneuploidii asociată cu creşterea heterozigoţilor recesivi), dar ele sunt mici şi temporare.

În realitate este imposibil de trasat o linie de demarcaţie clară între ceea ce este eugenic şi ceea ce nu este. Filosoful american Philip Kitcher (1996) propune evaluarea oricărei acţiuni practice ca fiind sau nu eugenică pe baza a patru criterii: (1) dacă acţiunea este sau nu discriminatorie; (2) gradul de libertate sau coerciţie în luarea deciziilor reproductive; (3) criteriile care ghidează opţiunile, alegerile; (4) calitatea informaţiei genetice utilizată pentru luarea deciziilor. Există cert riscurile unui derapaj eugenic; starea actuală a cunoştinţelor şi tehnicilor au spulberat inocenţa noastră genetică şi nu ne mai permite să acţionăm ca şi cum nu am şti că există aceste riscuri.

- Referindu-ne la gradul de libertate sau coerciţie, vom preciza că nu este suficient să privim libertatea numai din punct de vedere legal; într-o societate liberală constrângerile economice pot avea o formă puternic coercitivă. Dacă costurile îngrijirii şi educării copiilor cu nevoi speciale sunt crescute şi cad numai în sarcina părinţilor, opţiunile lor reproductive vor fi determinate de această constrângere (avortul terapeutic este o soluţie forţată).
- Criteriile ce ghidează alegerile pot crea probleme serioase: „...dacă societatea nu ia măsurile cele mai eficace pentru a asigura cele mai bune condiţii de asistenţă medicală şi socială pentru copiii (şi eventual adulţii) cu nevoi speciale, se va dezvolta o eugenie «liberă» care va genera intoleranţă faţă de «anormali», ceea ce nu este acceptabil" (N. Lenoir).

Toţi cei implicaţi în activităţi/tehnici genetice ce ar putea deveni eugenice au *responsabilitatea* de a evita riscurile derapajului. Trebuie să veghem ca erorile/ororile trecutului să nu se repete niciodată şi sub nici o formă. *Etica responsabilităţii* consideră că libertatea individului face parte integrantă din demnitatea sa, dar îi impune să ia parte la evoluţia societăţii. Faptul că ştiinţa „constituie adevăruri fără finalitate" (G. Canguilhem) îl face pe om responsabil de folosirea progreselor. Or, aceasta este vocaţia eticii ce vizează *să dea un sens* pozitiv progreselor ştiinţei şi tehnicii.

CASETA 21.2

Clonarea

Pentru prima dată în istoria biologiei, la 27 februarie 1997, un grup de cercetători de la Institutul de biotehnologie animală Roslin (Edinburgh), condus de Ian Wilmutt, *au anunţat că au reuşit* clonarea unui mamifer adult. *Cercetătorii au creat o oaie (Dolly) fără părinţi, folosind o celulă diferenţiată (prelevată din glanda mamară) a unui animal adult. Dolly este deci o oaie monoparentală, sora geamănă a mamei sale.*

*Ştirea clonării unui mamifer adult a produs senzaţie în lumea ştiinţifică (deoarece se credea că acest lucru este imposibil) şi o vie emoţie în marele public, confruntat imediat cu ideea posibilităţii reproducerii acestei experienţe la om. Numeroşi oameni politici şi diverşi cercetători au cerut interdicţia mondială a clonării umane. Se pune firesc întrebarea: „...*frica de clone este justificată?". *Înainte de a răspunde este util să înţelegem ce este clonarea şi ce „s-a întâmplat" la Roslin Institut.*

Se ştie de câteva decenii că patrimoniul genetic al tuturor celulelor somatice este identic, *deoarece miliardele de celule care alcătuiesc un organism provin, prin* mitoză, *din zigot. Cu alte cuvinte, fiecare nucleu al unei celule somatice conţine întreaga informaţie genetică pentru dezvoltarea unui nou individ. Steward (1970) a reuşit prima clonare la plante, pornind de la o celulă specializată, şi metoda devine larg în lumea vegetală. Posibilitatea clonării la animale a fost demonstrată la amfibieni (Gurdon, 1962) şi apoi la şoarece şi iepure (Markert; Bromhall, 1975) prin* transferul unui nucleu al unei celule somatice diferenţiate într-un ovul enucleat. *Aceste experienţe au demonstrat că patrimoniul genetic al celulelor somatice posedă „programul genetic" necesar pentru reconstituirea unui organism întreg.*

Totuşi, clonarea unui mamifer pe baza unei celule adulte era considerată imposibilă deoarece se considera că potenţialul genetic de „reconstituire" era definitiv inactivat în celulele specializate, care exprimă doar o parte a genomului, atât cât este necesară funcţiei celulei respective. Când se vorbea de clonare se evoca simpla fracţionare a unui embrion *aflat într-un stadiu precoce (cu celule „totipotente", nediferenţiate, care conservă intactă capacitatea de a exprima toate informaţiile lor) într-un număr de fragmente care se puteau reimplanta la femele purtătoare. Era deci o metodă artificială de creare a gemenilor monozigoţi, dar imitând un procedeu natural; aceşti gemeni, strict identici genetici, erau însă obţinuţi prin fecundare.*

Tehnica prin care cercetătorii din Edinburgh au „creat-o" pe Dolly se poate rezuma la următoarele etape:

– se extrage o celulă fibroblastică din glanda mamară de la oaia A, care va fi clonată, şi se pune în cultură; după câteva multiplicări, celulele rezultate au fost supuse unei privaţii nutritive cu scopul de a inhiba acţiunea genelor lor;

– *se prelevează (într-un moment special al ciclului biologic) un ovul nefecundat de la o oaie B – de altă rasă comparativ cu A şi se elimină nucleul; apoi se fuzionează celula glandei mamare A (care va fi clonată) cu ovulul enucleat B, fuziune stimulată de un câmp magnetic;*

– *se implantează „zigotul" astfel obţinut în uterul oii C, care va naşte (după 150 zile) un mieluţ D; acesta este identic cu oaia A (Dolly s-a născut în iulie 1996 şi a fost urmărită 7 luni înainte de a se comunica rezultatul în presă; identitatea genetică a fost demonstrată prin studiul polimorfismului microsateliţilor).*

Metoda utilizată pentru clonarea unui mamifer este foarte complexă (cu subtilităţi tehnice de vârf), aleatorie (pentru a o obţine pe Dolly s-au făcut 300 de tentative similare şi însăşi autorii recunosc că au avut şansă) şi deci costisitoare, cu riscuri malformative şi genetice importante. Este puţin probabil ca prin această metodă se va realiza o clonare „în masă", atunci când tehnicile „tradiţionale" sunt mult mai simple, mai ieftine şi mai eficace. În ciuda unor dificultăţi reale, folosindu-se tehnica transferului nuclear al unei celule somatice *într-un ovul enucleat (*metoda Honoloulou*) la numai un an după Dolly au fost clonaţi primii şoareci, iar apoi alte mamifere (porc, pisică, vacă).*

Scopul tuturor acestor cercetări de clonare reproductivă nu a fost de a obţine copii ale unor animale deja existente ci de a crea, printr-o metodă nouă (mai simplă şi mai eficace), animale transgenice, *ce posedă caractere genetice care nu există în natură. Ele ar putea fi folosite ca modele experimentale pentru boli umane (de exemplu, mucoviscidoză, boala Alzheimer ş.a.), pentru obţinerea unor celule stem sau a unor substanţe terapeutice (anticorpi, factori de coagulare etc.); o altă aplicaţie ar putea fi modificarea genetică a unor animale (de exemplu, porcul) pentru ca organele lor să fie tolerate de sistemul imun şi utilizate în transplantare la om. Studiul clonelor ar putea aduce informaţii preţioase privind o serie de fenomene implicate în dezvoltarea embrionară şi îmbătrânire.*

Era firesc ca aceste experienţe de clonare reuşită la mamifere să producă o vie emoţie în marele public, confruntat cu ideea posibilităţii reproducerii lor la om. Cineva spunea: „...tot ce este posibil se va face inevitabil". *Parcă pentru a confirma această idee, la 26 decembrie 2003, Brigitte Boisselier – directoarea unei companii private, „Clonaid" – anunţa naşterea primului copil clonat (botezat, nu întâmplător, Eva); ştirea a creat, firesc, senzaţie, dar nu a putut fi confirmată, Clonaid refuzând orice verificare ştiinţifică. Reală sau nu, posibilitatea* ***clonării reproductive*** *a generat numeroase reacţii care, în esenţă, se opun acestui tip de experiment, din raţiuni etice şi ştiinţifice.*

- *Atâta timp cât procesele dezvoltării embrionare nu sunt încă elucidate, orice tentativă de acest fel este o formă grosolană de experiment pe om, interzisă de reglementările legislative europene, codurile bioetice în vigoare şi de morala religioasă.*
- *În clonarea mamiferelor s-a folosit genomul nuclear al unei* celule mature, *care a efectuat deja un număr de diviziuni şi deci* „are vârsta cromozomilor ei" *(vezi teoria telomerică a senescenţei). În reproducerea sexuată, după fecundare, natura procedează la o repunere la zero* „a contorului vieţii"; *în plus, există – foarte probabil – mecanisme care asigură în principiu eliminarea combinaţiilor genetice defectuoase. Creată dintr-o celulă a unui individ* adult, *al cărui ADN a suferit probabil* mutaţii somatice *şi a realizat cu certitudine un număr de replicări (ce scad din „timpul programului vital") – clona riscă o îmbătrânire prematură sau dezvoltarea unor cancere (acest lucru s-a întâmplat deja cu Dolly, care după câţiva ani a murit).*
- *Cea mai puternică obiecţie etică la clonarea reproductivă este cuprinsă în Declaraţia UNESCO şi Convenţia asupra Drepturilor Omului şi Biomedicinei, Consiliul Europei, 1998, care declară practica clonării „contrară demnităţii umane". În final, a clona înseamnă a exercita un control fără precedent asupra patrimoniului genetic al unui alt individ.*

Cu toate aceste justificate rezerve privind posibilitatea clonării reproductive la om, există deja unele voci care susţin că a interzice clonarea – mai ales dacă urmăreşte scopuri terapeutice – înseamnă a refuza o tehnică care poate avea utilităţile sale. „Ştiinţa nu trebuie îngrădită, ci trebuie stabilite numai regulile de aplicare a unor metode, pentru a evita derapajul folosirii lor neadecvate... Toate marile descoperiri sunt purtătoare de pericole potenţiale, dar şi de avantaje considerabile de care nu ne putem lipsi" *(J.F.Mattei). Treptat lucrurile încep să se nuanţeze, deosebindu-se clar clonarea („transferul nucleului unei celule somatice") „reproductivă" (producerea unui embrion uman cu scopul de a se iniţia o sarcină şi a se naşte un copil) de* ***clonarea „terapeutică"*** *sau, mai corect, clonarea pentru cercetări bio-medicale. În a doua variantă se urmăreşte obţinerea unor celule stem (suşă) pluripotente care au potenţialul de a produce* in vitro *celule sau ţesuturi normale, utile pentru înlocuirea celor distruse prin diferite boli degenerative (vezi şi subcapitolul 20.A.5).*

Cercetările bio-medicale pe embrioni umani ridică firesc probleme etice particulare: „embrionul este o ființă umană?"... „este moral să creezi un embrion pentru a-l distruge ulterior, să sacrifici o viață pentru a salva altă viață?" ... „de ce se fac cercetări pe embrioni umani atunci când ele se pot iniția pe embrioni de mamifere sau se pot studia celulele stem recoltate de la adulți?". Apărătorii clonării bio-medicale susțin că ceea ce se creează prin transfer nuclear nu este un embrion (nu a avut loc fertilizarea și nici implantarea in utero*), ci numai o entitate biologică (o colecție de celule sau* viață celulară*) cu potențial de transformare în embrion sau o formă de* viață umană *(deci un fel de „pro-embrion"), dar în nici un caz „o persoană" sau „ființă umană". În aceste condiții, clonarea bio-medicală reprezintă o modalitate potențială de reducere a suferinței umane și de tratament a unor boli fatale, care nu poate fi ignorată sau interzisă.*

Bibliografie specifică selectivă

1. ***. *Ethical Issue in Medical Genetics and Genetic Service*. Report of WHO Meeting on Ethical Issues in Medical Genetics, Geneva, 1997.
2. ***. *HUGO Ethical, Legal and Social Issues Committee Report to HUGO Council based on Ethical Issues in International Collaborative Research on the Human Genome*. 1999.
3. ***. *Lois nr.94-653 et 94-654 du 29 Juillet 1994 relative au respect du corps humain et au don, à l'utilisation des éléments et produits du corps humain à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal*. Journal Officiel de la République Française, 30 Juillet 1994; 11056-11068.
4. ***. *Déclaration d'Inuyama de 21-eme Congres du Conseil des Organisation Internationales des Sciences Médicales. Génétique, l'éthique et la valeur humaine*. 27 iulie 1990.
5. ***. Textes du Conseil de l'Europe en matière de Bioéthique-Conseil de l'Europe, Strasbourg, 1993.
6. ***. *Data storage and DNA banking for biomedical research: technical, social and ethical issues*. Recommandations of the European Society of Human Gnetics. Europ J Hum Genet 2003; 11:S8-10.
7. ***. *Population genetic screening programmes; technical, social and ethical issues*. Recommendations of the European Society of Human Genetics. Europ J Hum Genet 2003; 11:S5-7.
8. ***. *Genetic information and testing in insurance and employment: technical, social and ethical issues. Recommendation of European Society of Human Gnetics*. Europ J Hum Genet 2003; 11:S11-12.
9. Astărăstoae V, Almoș TB. *Esentialia în Bioetică*. Editura Cantes, Iași, 2000.
10. Astărăstoae V, Stoica O, Groll M. *Bioetică și Biotehnologie*. Rev Med Chir 1991; 97:345-349.
11. Astărăstoae V, Stoica O. *Genetică versus Bioetică*. Editura Polirom, Iași, 2002.
12. Burke W. *Genetic testing*. N Eng J Med 2002; 347:1867-1875.
13. Clayton EW. *Ethical, legal and social implications of genomic medicine*. N Engl J Med 2003; 349:562-569.
14. Duncan RE, Delatycki MB. *Predictive genetic testing in young people for adult onset conditions: where is the empirical evidence?* Clin Genetic 2006: 69:8-16.
15. Fletcher JI, Wertz DC. *Ethical medical Genetics*. Am J Med Gen 1988; 29:815-827.
16. Gavrilovici C. *Introducere în bioetică*. Rev Rom de Bioetică 2004; 2:3-6.
17. Gavrilovici C. *Ce este etica. Ce este bioetica.* În *Introducere în bioetică*. Ed. Junimea, Iași, 2007, 5-10.
18. Gayon J. *Eugénisme*. În Feingold J, Fellous M, Solignac M. *Principes de génétique humaine*. Ed. Herman Paris, 1998, 459-483.
19. Henderson GE. *Research in medical ethic: genetic diagnosis*. În Sagarman J, Sulmasy DP. *Methods in medical ethics*. Georgetown Univ Press, Waghington DC, 2001.
20. Hottois G, Hottois M-H. *Les mots de la bioethique. Un vocabulaire encyclopédique*. Ed. De Boech Université, 1995.
21. Hudson KL. *Prohibiting genetic discrimination*. N Engl J Med 2007; 356:2012-2023.
22. Karp DR, Carlon S *et al. Ethical and practical issues associated with aggregating databases*. PLOS genet 2008; 6:e190.
23. Khoury MJ, McCabe LL, McCabe ERB. *Population screening in the age of genomic medicine*. N Engl J Med 2003; 348:50-58.
24. Knoppers BM, Bordet S, Isasi RM. *Preimplantation genetic diagnosis: an overview of socio-ethical and legal considerations*. Annu Rev Hum Genet 2006; 7:201-221.
25. Lenoir N. *Éthique et société*. În Feingold J, Fellous M, Solignac M. *Principes de génétique humaine*. Ed. Herman, Paris, 1998, 485-510.
26. Macer RJ Darryl. *Ethics, Law and Science of Using New Genetic Technology in Medicine*. Eubios Ethics Institute, 1990.
27. Mattei JF, Rauch C. *Génétique et société; implications étiques et juridiques*. Rev Pract 1997; 47:182-190.
28. Oduncu FS. *The role of non-directivenes in genetic counselling*. Med Health Care Phil 2002; 5:53-63.

BCU "IULIU HAȚIEGANU" UNIVERSITY LIBRARY

29. Reilly PR, Boshar MF, Holtzmann SH. *Ethical issues in genetic research: disclosure and informed consent.* Nature Genet 1997; 15:16-20.
30. Rocge PA, Annas GJ. *DNA testing, baking and genetic privacy.* N Engl J Med 2006; 355:545-546.
31. Terry SF. *Genetic information nondiscrimination act insurance protection isseued.* Genet testing molec biomarkers 2009; 13:709-710.
32. Weil J. *Psychosocial genetic counselling in the post/nondirective era: a point of view.* J Gen Couns 2003; 12:199-211.
33. White MT. *Decision-making through dialogue: reconfiguring autonomy in genetic counselling.* Theoret Med Bioethics 1998; 19:5-19.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBLIOGRAFIE GENERALĂ

1. Aase JM. *Diagnostic dysmorphology*. Plenum medical Book Co, New York, 1990.
2. Adams RPL, Knowler JT, Lrader DP. *Biochemistry of the Nucleic Acids*. ed. a XI-a. Chapman and Hall, Londra, 1992.
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the cell*. ed. a III-a. Garland Publishing, New York, 1994.
4. Ayala FJ, Kiger JA. *Modern Genetics*. Benjamin/Cummings Publishing Co., Menlo Park, California, 1984.
5. Baker DL, Schuette JL, Uhlmann WR. *A guide to genetic counselling*. Wiley-Liss, New York, 1998.
6. Baraitser M, Winter RM. *Color atlas of congenital malformation syndromes*. Mosby-Wolfe, Londra, 1996.
7. Bates B. *A guide to physical examination*. ed. a III-a. Lippincott, Philadelphia, 1983.
8. Beauchamp TL, Childress JF. *Principles of biomedical ethics*. ed. a IV-a. Oxford University Press, New York, 1994.
9. Bembea M. *Genetică medicală şi clinică*. Editura Universităţii Oradea, 2001.
10. Bennett RL. *The practical guide to the genetic family history*. Wiley-Liss, New York, 1999.
11. Black GCM. *Genetics for ophthalmologists*. ReMedica, Londra, 2001.
12. Bonthron DT, FitzPatrick DR, Porteous MEM, Trainer AH. *Clinical Genetics: a case-based approach*. WB Saunders Co, Londra, Philadelphia, 1998.
13. Brown TA. *Genome 3*. Garland Science, New York, Londra, 2007.
14. Carradine CR, Drew HR. *Understanding DNA*. Academic Press, Londra, 1997.
15. Cassidy SB, Allanson JR. *Management of genetic syndromes*. Willey-Liss Inc., New York, 2001.
16. Ciofu EP, Ciofu Carmen (ed.). *Pediatrie-Tratat*. Editura Medicală, Bucureşti, 2001.
17. Cohen MM. *The child with multiple birth defects*. Oxford University Press, Oxford, 1997.
18. Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular pathology: The molecular basis of Human diseases*. Elsevier, 2009.
19. Connor M, Ferguson-Smith M. *Essential medical genetics*. ed. a VII-a. Blackwell Science, Oxford, 2007.
20. Cooper DN, Krawczak M. *Human Mutations*. Bios Scientific, Oxford, 1993.
21. Covic M, Covic A. *Boala polichistică renală autosomal dominantă*. Editura Polirom, Iaşi, 1999.
22. Covic M. *Biologie şi genetică medicală*. Ed. Didactică şi Pedagocică, Bucureşti, 1982.
23. Covic M. *Principii de genetică medicală*. În Ciofu EP, Ciofu C (ed.). *Pediatrie-Tratat*. Editura Medicală, Bucureşti, 2001.
24. Daniel A. *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. AR Liss, New York, 1998.
25. Day INM, Humphries SE. *Genetics of common diseases*. Bios, Oxford, 1997.
26. Emery AEH. *Neuromuscular disorders: clinical and molecular genetics*. Oxford University Press, Oxford, 1998.
27. Etienne J, Clauser E. *Biochimie genetique - Biologie moléculaire*. Masson, Paris, 2001.
28. Feingold J, Fellous M, Soulignac M. *Principes de genetique humaine*. Hermann ed., Paris, 1998.
29. Firth HV, Hurst JA, Hall J. *Oxford Desk Refence. Clinical genetics*. Oxford University Press,2006.
30. Friedman JM, Dill FJ, Hayden MR, McGillivry BC. *Genetics*. NMS-Harwal Publishing Company, Malvern, Pennsylvania, 1996.
31. Gardner RJM, Sutherland GR. *Chromosome abnormalities and Genetic Counselling*. ed. a III-a. Oxford University Press, Oxford, 2004.
32. Gelherter TD, Collins FS, Ginsburg D. *Principles of medical genetics*. ed. a II-a, Williams & Willkins Co., Baltimore, 1998.
33. Geormăneanu C, Geormăneanu M. *Introducere în genetica pediatrică*. Editura Medicală, Bucureşti, 1986.
34. Gilbert-Barnes E. *Potter's Pathology of the fetus and Infant*. ed. a IV-a. WB Saunders, Philadelphia, 1997.
35. Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS. *Oxford monographs on medical genetics no.19: Syndromes of the head and neck*. ed. a III-a. Oxford University Press, New York, 1990.
36. Griffiths A, Gelbart W, Miller J, Lewontin R. *La génétique des populations et l'évolution in Analyse génétique moderne*. Ed. DeBoeck Université, 2001.
37. Grigorescu-Sido P. *Tulburări de diferenţiere sexuală în patologia infantilă*. Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1993.
38. Grouchy J De, Zurleau C. *Atlas de maladies chromosomiques*. Expansion Scientifique, Paris, 1982.
39. Grumbach MM, Conte FA. *Disorders of sex differentiation*. În Wilson JD, Foster DW, Larson PR (ed.). *Williams Textbook of endocrinology*. ed. a IX-a, WB Saunders, Philadelphia, 1998.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

40. Hall JD, Froster-Iskenius UG, Allanson JE. *Handbook of normal Physical measurements*. Oxford University Press, New York, 1989.
41. Handel MA (ed.). *Meiosis and gametogenesis*. Academic Press, San Diego, 1998.
42. Harper PS. *Practical genetic counselling*. ed. a V-a. Butterworth Heinemann, Oxford, 1998.
43. Hartl DL, Freifeelder D, Snyder LA. *Basic Genetics*. Jones and Bartlett Publishers, Portola Valley, California, 1988.
44. Hodgson SV, Maher ER. *A practical guide to human cancer genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, 1999.
45. Hoffee P. *Medical Molecular Genetics*. Fence Creek Ubblishing, LLC, Madison, Connecticut, 1998.
46. Holt I (ed.). *Genetics of Mitochondrial Disease*. Oxford University Press, 2003.
47. Horwitz M. *Basic concept in medical genetics*. Mc Graw-Hill, New York, 2000.
48. Jameson JL. *Principles of molecular medicine*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998.
49. Jeanpierre M, Jonveaux Ph, Lacombe D *et al. Génétique Médicale*. Masson, Paris, 2004.
50. Jones KL (ed.). *Smith's recognizable patterns of human malformations*. ed. a V-a. Saunders, Philadelphia, 1997.
51. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. *Medical Genetics*. Mosby, St Louis, 2006.
52. Kaplan JC, Delpech M. *Biologie moléculaire et médecine*. ed. a III-a. Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, 2007 :
53. King RA, Rotter JL, Motulsky AG. *The Genetic Basis of Common Diseases*. Oxford University Press, Oxford, 1992:
54. King RC, Stansfield WD, Mulligan PK. *A dictionary of genetics*. ed. a VII-a, Oxford University Press, Oxford, 2006.
55. Kingston M. Helen. *ABC of clinical genetics*. BMJ Books, Londra, 2002.
56. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA, Palladino MA. *Concepts of Genetics*. Pearson Education Inc., San Francisco, 2009.
57. Korf BR. *Human genetics, a problem-based approach*. Blackwell Science, Cambridge, 2006.
58. Kuller JA, Chescheir NC, Cefalo RC. *Prenatal diagnosis and reproductive genetics*. Mosby, St. Louis, 1996.
59. Kumar D, Weatherall D. *Genomics and clinical medicine*. Oxford University Press, Oxford, 2008.
60. Lalloo FI. *Genetics for oncologists*. ReMedica, Londra, 2001.
61. Larsen W. *Essential of human embryology*. Churchill Livingstone, New York, 1998.
62. Levin B. *Genes VII*. ed. a VII-a. Oxford University Press, Oxford, 2000.
63. Levis R. *Human Genetics. Concepts and applications*. ed. a II-a. Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, 1997.
64. Lewin R. *Principles of Human Evolution*. Blackwell Science, Boston, 1998.
65. Lodish H, Baltimore D, Berk A *et al. Molecular cell biology*. Scientific American Books, New York, 1995.
66. Lyonnet S, Munnich A. *Génétique pédiatrique*. Doin ed., Paris, 1998.
67. Mange EJ, Mange AP. *Basic human genetics*. ed. a II-a. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 1999.
68. Maximilian C, Duca Marinescu D. *Sfaturi genetice*. Scrisul Romanesc, Craiova, 1977.
69. Maximilian C, Ioan D. *Dicționar enciclopedic de genetică*. Editura Științifică, București, 1984.
70. Maximilian C, Ioan D. *Genetică medicală*. Editura Medicală, București, 1986.
71. Maximilian C, Poenaru LM, Bembea M. *Genetică clinică*. Editura Pan, București, 1996.
72. McKusick VA. *Mendelian inheritance in man: catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes*. ed. a XII-a, Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1998.
73. Milunsky A. *Genetic disorders and the fetus: diagnosis, prevention and treatment*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1998.
74. Mueller RF, Young ID. *Emery's elements of medical genetics*. ed. a X-a. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1998.
75. Murray A, Hunt T. *The Cell Cycle: An Introduction*. Oxford University Press, Oxford, 1994.
76. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson "Genetics in Medicine"*. ed. a VII-a. WB Saunders Company, Philadelphia, 2007.
77. Ostrer H. *Non-mendelian inheritance in humans*. Oxford University Press, Oxford, 1998.
78. Passarge E. *Color Atlas of Genetics*. ed. a III-a. Theme Verlag, Stuttgart, 2007.
79. Pasternak JJ. *An Introduction to Human Molecular Genetics*. ed. a II-a, Willey, 2005.
80. Pierce BA. *Genetics: a Conceptual Approach*. WH Freeman and Company, New York, 2008.
81. Plomin R, Defries JC, McClearn GE, Rutter M. *Behavioural genetics*. Freeman, New York, 1997.
82. Popa I, Pop L, Popa Z. *Fibroza chistică (Mucoviscidoza)*. Editura Viața Medicală, București, 1998.
83. Pope FM, Smith R. *Color atlas of inherited connective tissue disorders*. Mosby-Wolf, Londra, 1995.
84. Pulst SM. *Neurogenetic*. Oxford University Press, Oxford, 2000.
85. Riccardi VM. *The genetic approach to human diseases*. Oxford University Press, New York, 1977.
86. Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. ed. a V-a. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2007.
87. Robinson A, Linden MG. *Clinical genetics handbook*. Blackwell Scientific, Boston, 1993.
88. Rooney DE, Czepulkowski BH (ed.). *Human Cytogenetics: a Practical Approach*. IRL Press, Oxford, 1992.
89. Ross DW. *Introduction to oncogenes and molecular cancer medicine*. Springer, Berlin, 1998.
90. Russell PJ. *iGenetics. A molecular Approach*. ed. a III-a. Pearson Education Inc, San Francisco, 2010.
91. Rusu V. *Dicționar medical*. Editura Medicală, București, 2010.
92. Sack GH Jr. *Medical Genetics*. Mc Graw-Hill, New York, 1999.
93. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (ed.). *The Metabolic Bases of Inherited Disease*. ed. a VIII-a. McGraw-Hill, New York, 2000.

94. Shepard TH. *Catalog of teratogenic agents*. ed. a VIII-a. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1996.
95. Simpson JL, Golbus MS. *Genetics in obstetrics and gynaecology*. Saunders, Philadelphia, 1998.
96. Speicher MR, Antonrakis SE, Motulsky AG. *Vogel and Motulsky's – Human Genetics. Problemes and Approaches*. ed. a IV-a. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010.
97. Spitz J. *Genodermatoses*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1996.
98. Ştefănescu D, Călin G. *Genetica şi cancerul*. Editura Didactică şi Pedagocică, Bucureşti, 1996.
99. Ştefanescu DT, Călin GA, Ştefănescu F. *Genetică Medicală. Progrese Recente*. Editura Tehnică, Bucureşti, 1998.
100. Ştefănescu DT, Paşcanu I, Cseh K. *Genetică Medicală*. UMF, Târgu Mureş, 2001.
101. Stevenson RE, Hall JG, Goodman RM. *Human malformations and related anomalies*. Oxford University Press, Oxford, 1993.
102. Stevenson RE, Schwartz CE, Schorer RJ. *X-linked mental retardation*. Oxford University Press, Oxford, 2000.
103. Stine GJ. *The new human genetics*. Wm C Brown Publishers, Iowa, 1989.
104. Strachan T, Read A. *Human Molecular Genetics*. ed. a IV-a. Garland Science, 2010.
105. Suner AT. *Chromosome Banding*. Unwin Hyman, Londra, 1990.
106. Suzuki DT *et al. Introduction à l'analyse génétique*. Ed. Universitaires, Paris, 1991.
107. Swallow DM, Edwards YH. *Protein dysfunction in human genetic disease*. Bios Scientific Publishers, 1997.
108. Sybert VP. *Genetic skin disorders*. Oxford University Press, Oxford, 1997.
109. Tauser G, Stoica O. *Strategia antisens*. Editura Junimea, Iaşi, 2003.
110. Therman E, Sulsman M (ed.). *Human chromosomes: Structure, Behavior and Function*. ed. a III-a. Springer, New York, 1992.
111. van Driel R, Otte AP. *Nuclear organisation, Chromatin structure and gene expression*. Oxford University Press, Oxford, 1997.
112. Turnpenny P, Ellard S. *Emery's Elements of Medical Genetics*. Churchill Livingstone, 2009.
113. Vogelstein B, Kinzler KW. *The genetic basis of human cancer*. McGraw Hill, New York, 1998.
114. Wendell WW. *Pharmacogenetics*. Oxford University Press, 1997.
115. Wilson GN. *Clinical Genetics. A short Course*. Wiley-Liss Publ., New York, 2000.
116. Wright A, Hastie N. *Genes and common diseases*. Cambridge University Press, 2007.
117. Young ID. *Medical Genetics*. Oxford University Press, 2005.
118. Young ID. *Bailleres's Clinical paediatrics. The new genetics*. Bailliere Tindall, Londra, 1993.
119. Young ID. *Introduction to risk calculation in genetic counselling*. ed. a II-a. Oxford University Press, 1999.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INDEX GENERAL

AB0, *v.* grup sangvin AB0
Abordare genetică, 17, 321
ACE, *v.* enzima de conversie a angiotensinei
Acetilare histone, 126
Acetilatori lenți, 327, 330
Acetilcolinesteraza, 623
Acidul folic (în)
  boala coronariană, 475
  malformații congenitale, 326
  defecte de tub neural, 488
Acidul retinoic, 200, 616
Acondroplazia, 214, 420, 510
ADA, *v.* deficiența adenozin dezaminazei
ADN
  cantitate totală la om, 75
  catenă sens și antisens, 112
  catene antiparalele, 27
  clonare, 145
  codant, 77
  complementar (ADNc), 30,148
  complementaritatea bazelor, 27
  configurație, 125
  denaturare, 28
  deșeu, *v.* ADN inutil
  dezoxiribonucleotide, 25
  extragenic, 77, 86
  genic, 77
  flexibilitate, 30
  funcții, 1-2
  heterogenitate secvențe, 76
  hibridizare, 28, 155
  inutil, 78, 80
  izoforme, 30, 125
  înalt repetitiv, 76
  metilare, 127
  mitocondrial, 2, 93, 453
  moderat repetitiv, 76
  necodant, 78, 80, 86
  nerepetitiv, 76
  organizare celulară, 31
  polimorfism, 287
  quadruplex G, 125
  recombinant, 11, 146, 148, 151
  relații structură – funcție, 28
  renaturare, 28
  reparare, *v.* repararea ADN
  repetitiv, 74, 76, 86, 88-90
  replicare, *v.* replicarea ADN
  roluri majore, 1-2
  rol genetic, 23
  satelit, 39, 76, 88
  secvențiere, 161-162
  senestra, *v.* ADN-Z
  sonde, 46
  stabilitate metabolică, 28
  structură
    alternativă, 30
    primară, 25
    secundară, 26
  supraînrulare, 125
  șanțuri laterale, 25
  tetrada G, 125
  transfer, 24
ADN-B, 30
ADN-demetilaze, 127
ADN-helicaze, 180
ADN-ligaze, 183
ADN-metiltransferaze, 127
ADN-polimeraze, 180, 263
ADN-topoizomeraze, 180
ADN-Z, 30, 125
ADNc, *v.* ADN complementar
ADNmt, *v.* ADN mitocondrial
Autocorecție, 186
Acrocentrici, *v.* cromozomi
Activatorii transcripției, 71, 135
ADAM, 311, 315
ADH, 326, 487
Adiacent-1 sau -2, *v.* translocațiile reciproce
ADPKD, 442, 681
Adopție, 232
Adrenoleucodistrofia, 427
AFP, *v.* alfa fetoproteina
Agregare familială, 230
AIS, *v.* sindrom de insensibilitate la androgeni
Albinismul ocular, 97
Alcaptonuria, 104
Alcoolismul, 326, 486, 521
  ALDH, 326, 487
Alele, *v.* gene alele
Alele multiple, *v.* polialelie
Alfa$_1$-antitripsină, 286, 327, 420, 667
Alfa fetoproteina, 489, 623-624
Algoritm diagnostic
  anomalii congenitale multiple, 358
  retard mental, 558
Alu, *v.* familia *Alu*
Altern, *v.* translocațiile reciproce
Alzheimer, *v.* boala Alzheimer
Amenoree primară, 411
Amiotrofii spinale infantile, *v.* atrofia musculară spinală
Amiloid beta, 483
Amino-acil-ARNt-sintetaza, 119
Aminoacizi, abrevieri, 117
Amniocenteză, 638
Amorse, 152, 181
AmpliChip, 329
Amplificare
  genică, 279, 595
  sinteză proteine, 114
  terapie genică, 657
Amprenta(re)
  ADN, 294
  genetică, 76
  genomică/parentală 130-131, 226, 278
Anafaza,
  meiozei, 198
  mitozei, 193
Analiză acizilor nucleici
  ADN fetal în sânge matern, 645
  ADN genomic, *v.* Southern blot
  analiză genotipică, 155
  ARNm, *v.* Northern blot
  cu sonde oligonucleotidice specifice unei alele (ASO), 159
Analiză de asociere la nivelul întregului genom, 175, 473
Analiză celule fetale sânge matern, 645
Analiza cromozomilor, 42, 360
  indicații, 361
  metode, 42-50
  postnatal, 362
  prenatal, 362, 640
Analiza de înlănțuire, 175, 238, 472
Analiza proteinelor, *v.* Western blot
Anamneză
  familială, 348-352
  personală, 348
Androgeni
  anomalii acțiune/recepție, 535
Anemia Fanconi, 278
Anemia hemolitică cu hematii în seceră, *v.* sicklemia

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Anencefalie, 488
Aneuploidie, 268, 371
Aneusomie segmentară, 394
Angiogeneză tumorală, 600
Animale transgenice, 149
Animale knockout, 170
Ankirină, 437
Anomalii congenitale, 495
Asociații malformative, 518
  cauze, 519-521
  clasificare, 516-518
  complexe, 517
  defecte de câmp de dezvoltare, 517
  definiție, 515
  deformații congenitale, 516
  diagnostic, 521
  dirupții congenitale, 516
  displazii congenitale, 516
  importanță, 495, 515
  izolate, 355, 515
  majore, 355, 518
  malformații congenitale, 516
  minore, 355, 518-519
  multiple, 355, 358, 516-518
  primare, 355
  profilaxie, 523
  secundare, 355, 517
  secvențe, 517
  sindroame plurimalformative, 518
Anomalii cromozomiale
  autozomale, 263
  (în) cancer, 278, 595
  cauze, 282
  clasificare, 267
  clonale, 278
  consecințe fenotipice, 279
  constituționale, 278
  dobândite, 278
  echilibrate, 280
  frecvență, 281
  funcționale, 277
  gonozomale, 268, 531
  gravitate, 383
  mozaicuri, 269
  neechilibrate, 280, 371, 383, 595
  numerice, 268, 371, 383
  omogene, 268
  semne comune, 383
  somatice, 267
  structurale, 269, 284, 383, 371
Anticipație, 255, 446
Anticodon, 119
Anticorp, 564
  monoclonali, 617, 649
  himerici, 650
  umanizați, 650
Antigene
  ABH, 109, 286
  carbohidrat în cancer, 616
  nuclear de proliferare celulară, *v.* PCNA
  tumorale, 603
Antioncogene, *v.* gene supresoare ale creșterii tumorale
Aparatul
  genetic, 1, 31
  de replicare, 180
  de translație, 118
Apendici nucleari, *v.* cromatina X
APC/C, 192, 194
APO-B, 141, 441
APOE, *v.* apolipoproteina E
AP-MS, 168
Apolipoproteina E, 475, 484
Apoptoză, 190, 511-512, 611
  în cancer, 601-602
Aptameri, 170, 651
Aptitudini reproductive, 303
Arbore
  genealogic, 349-352
  filogenetic cromozom Y, 314
  filogenetic mitocondrial, 314
Ardipithecus, 308
Arheobacterii, 124
Aril-hidrocarbon-hidroxilază, 326
Artrită reumatoidă, 488
Artrogripoza 516
ARN,
  clasic, 80, 87
  editare, 140
  structură, 80, 87
ARN de transfer, 119
ARN HOTAIR, 129
ARN necodant, 82, 123
ARN polimerază, 67, 113
ARN ribozomal, 118
ARN XIST, 129
ARNi, interferent, 170, 661
ARNlinc, 86
ARNm, 115
ARNm precursor, 113
  editare, 141
  maturare, procesare, 114
  modificare stocaj, 140
  modificare stabilitate, 141
ARNmi, 80, 86-87, 140, 142, 592
ARNom, 86
ARNpi, 129
ARNsi, 80, 86-87, 129, 142
ARNsn, 87, 115
ARNsno, 87
ARS, 39
Asimetria dreapta-stânga, 503
Asincronism de replicare, 181
ASO, 158-159
Asociații malformative, 518
  CHARGE, 518
  MURCS, 411, 518
  VATER, 518
Asociere alelică preferențială, 62
Asocieri genetice, 64
Asortare independentă, 306-207
Astmul bronșic, 473-474
Ataxia
  Friedreich, 255
  spino-cerebeloasă, 447, 451
Ataxia telangiectazia (AT), 266
Atenuatorii transcripției, 135
Atopie, 483
ATM, ATR, *v.* kinaze
Australopithecus, 308
Autism, 492
Autocorecție, 186
Autofagie, 510, 514, 602
Autonomie, 675
Autozomi, 38
Avorturi spontane, 413
AZF, 411
Azoospermie, 411
Axe, 493, *v.* specificarea axelor

BACs, *v.* cromozomi artificiali
Bacteriofagii, 149
Bancă de gene, *v.* biblioteci gene
Baze azotate, 25, 27
Bărbații XX, 531
BCR, receptori celule B, 563
Benzi cromozomiale, 42, 84
BER, *v.* repararea ADN
Biblioteci de gene, 151, 689
Bioetică
  diagnostic prenatal, 681, 684
  dileme și conflicte, 675
  genetica medicală, 674
  principii generale, 674
  screening genetic, 687
  sfat genetic, 677
  terapie genică, 608, 683
  testare genetică, 680, 685
Biopsia vilozităților coriale, 638
Biotransformare, 328
Bivalenți, 197
Blastocist, 494
BMP, 496, 502
Boala Alzheimer, 466-467, 473, 483
Boala celiacă, 326
Boala Charcot-Marie-Tooth, 201, 420, 466
Boala coronariană, 326, 475
Boala Crohn, 473
Boala Fabry, 426
Boala Friederich, 449
Boala Gaucher, 426, 668
Boala granulomatoasă cronică, 581, 670
Boala hemolitică a nou-născutului, 286
Boala Hirschprung, 104, 418
Boala Huntington, 214, 449

IOAN / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Boala Leber, 462, 671
Boala Leigh, 462
Boala Niemen Pick, 426
Boala polichistică renală a adultului (autozomal dominantă), *v.* ADPKD
Boala Parkinson, 466, 484
Boala pulmonară obstructivă cronică, 287
Boala Refsum, 427
Boala Tay-Sachs, 297, 301
Boală, 320-321
Boli autoimune, 512
Boli ciliare, 100, 229, 442
Boli complexe, *v.* boli multifactoriale
Boli comune ale adultului, 471
Boli cromozomiale, 6, 333
  autozomale, 384
  gonozomale, 404
Boli degenerative, 483
Boli ecogenetice, 322
Boli enzimatice, 421
Boli genetice,
  autozomal
    dominante, 300, 374
    recesive, 300, 375
  clasificare, 338
  caractere generale, 15, 337
  complexe, *v.* boli multifactoriale
  consecinţe, 339
  implicaţii, 14, 339
  incidenţă, 14
  mendeliene, *v.* boli monogenice
  moleculare, 417, 420
  monogenice, 6, 333, 417, 664
  recesive legate de X, 300
  registre, 620
  profilaxie, 619
  screening populaţional, 687
Boli genomice, 91, 95, 202, 253, 336
Boli lizozomale, 426
Boli metabolice, 422
Boli mitocondriale, 334, 458, 768
Boli moleculare, 108
Boli monogenice, 6, 333, 664
Boli multifactoriale, 7, 235, 334
  identificare gene, 471
  sfat genetic, 378
Boli prin anomaliile proteinelor (de)
  apărare imună, 438, 443-444
  citoschelet, 432
  comunicare intracelulară, 438
  control al dezvoltării, 438
  control hormonal, 443
  factori de transcripţie, 438-439
  hemostază, 444
  hemoglobină, 445
  hormoni şi factori de creştere, 438-439
  inhibiţie a proteazelor, 444
  matrice extracelulară, 434
  membrană, 434
  receptori, 438-439
  semnalizare intercelulară,438, 439
  structurale, 423, 433
  transducţie a semnalului, 438-439
  transport, 427-428, 430
Boli prin mutaţii dinamice, 446
Boli prin mutaţii somatice, 334
Boli neurodegenerative, 466, 512
Boli peroxizomale, 423, 427
Boli poliQ, 446
Boli rare, 16, 339
Bombay, fenotip, 110
Brahidactilia, 496

CAAT box, 70
Caderine, 433, 438
Cadru de lectură a genei, 67
CAIS, *v.* sindrom de insensibilitate la androgeni
Calcitonina, 115
Calea
  HH, 438, 495
  JAK-STAT, 138, 438, 495
  MEK-MAPK-ERK, 138, 438
  Notch-DLLP, 600
  P16-RB-E2F1, 609
  RTK, 438, 495
  TGF beta, 438
  VEGF, 600
  WNT, 438, 495, 612
Camtodactilia, 101
Canal clor, 428
Canale ionice, 428
Cancer(e)
  amplificare genică, 595
  angiogeneză tumorală, 600
  anomalii citogenetice, 593
  colorectal, 605
    non-polipozic ereditar, 263, 610
  cutanat, 327
  definiţie, 561
  diagnostic şi tratament, 616
  ereditare, 485, 606
  evoluţie multistadială, 605
  familiale, 615
  gene, 586
  invazie şi metastazare, 604
  modificări epigenetice, 598
  mutaţii ADNmt, 599
  predispoziţie genetică, 606, 615
  prostată, 595
  sân ereditar, 266, 606, 612
  telomerază, 183
  terapie genică, 662-663
CAP, 114, 120
Caractere
  ecologice, 6, 8
  ereditare normale, 6
  fenotipice, 5
  mendeliene, 208
  multifactoriale, 6, 98
Cardiomiocite, 500
Cariotip, 43
  digital, 52
  fetal, 640
  molecular, 161, 363
Cartografiere genetică, 174-176, 472
Caspaze, 190, 505
Catenele ADN, 25
  antiparalele, 26
  avansată, 183
  întârziată, 183
  matriţă, 111
  polaritate, 26
  (de) referinţă, 111
  sens şi antisens, 67, 111
Caz-control, 474
Căi de semnalizare, 137, 495
Câmp de dezvoltare, 505, 511, 517
Câştig de funcţie, 258
CDK,195
Celule
  gazdă, 148
  germinale, 525
  Leydig, 530
  NK, 561
  Sertoli, 530
  stem embrionare, 172, 495, 504, 652, 656
  stem canceroase, 597
CENP, 40, 195
CentiMorgan, 62
Centromer, *v.* cromozom
Centrozom, 193, 593
Centru de inactivare XIC 130, 132
Centre de genetică medicală, 15, 316, 379
CFTR, *v.* fibroza chistică
CGH, 48, 50, 161
Chaperones, *v.* proteine
CHARGE, asociaţie, 518
CHARPE, 611
Chiasma, 60
ChIP, 169
CHOP, 51
Cicline, 190
Ciclul celular, 187-192
Cil primar, 442
CIN, *v.* instabilitate cromozomială
Cip ADN, 159
Cis, *v.* faze de înlănţuire
Citocromul P450, 327-328

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Citogenetică
cancer, 363
clasică, 361
interfazică, 48
metode, 42,
moleculară, 48, 362, 642
tehnici, 45
Citokineză, 195
Citopatii mitocondriale, 464, 468
Citoschelet, 432
Citotrofoblast, 492
CKI, 190
Clastogen, 284
Clivarea transversală a centromerului, 195
Clone
ADN recombinant, 151
celulare, 145-146, 196
(de) expresie, 152
neoplazice, 585
Clonarea
ADN
acelulară, 146, 152
celulară, 145-146
moleculară, 145
gene,
funcțională, 176-177
pozițională, 176
reproductivă, 655, 691
cM, *v.* centiMorgan
CMT1A, vezi boala Charcot-Marie-Tooth
CNP, 80, 90, 95, 292
CNV, 51, 80, 82, 90, 95, 292
Coadă poliadenilică, 114
Cod
epigenetic, 125
genetic, 116
histone, 126
CODIS, 13, 77
Codominant, 59
Codon(i),
inițiator, 68-69, 116
sens, 117
sinonimi, 117
stop/nonsens, 69, 117
Coeficient de consangvinitate, 219
Coeficient de înrudire, 219
Coevoluția gene-cultură, 316
Coezina, 37, 194
Cofactori proteici ai translației, 120
Cohortă, 474
Co-IP, 169
Colagen, 433-434
Compartiment neproliferativ, 190
Compartimentalizare nucleară, 130
Complex(e)
cromozomial călător, 192
imune, 564
major de histocompatibilitate, 574
prereplicative, 181
remodelare cromatină, 147
RISC, RITS, 142
sinaptonemal, 192
transcripțional bazal, 114
Comutarea
de clasă, 561, 572
hemoglobinei, 137
Comutator, 68
Concepții despre boală, 320
Concordanță, 231
Condensina, 37, 194
Condensare prematură a cromozomilor, 189
Condrodisplazia
Grebe, 495
punctată, 427
Conexine, 438
Congenital, 337
Conjugare, 328
Consangvinitate, 219
Constricție primară, secundară, *v.* cromozom
Consult genetic, 345-360
Consultand, 208, 349
Conversie genică, 244, 251
Cordocenteza, 639
Coreea Huntington, *v.* boala Huntington
Coreoatetoză, 419
Corpuscul Barr, 33-34,
Corpuscul F, *v.* cromatina Y
Cosmide, 150
CO, *v. crossing-over*
CO inegal, 65, 201
CPC, 192
CPEO, *v.* oftalmoplegia externă cronică progresivă
Criptorhidism, 530
Creastă neurală, 499
Creste genitale, 518
Cromatide, *v.* cromozom
Cromatină, 76
configurație deschisă, 126
definiție, roluri, 27, 31, 32
decondensare, 126
eucromatină, 32, 76
fibre, 31
heterocromatină, 32, 76
modificarea conformațională, 126
remodelare, 126
replicare, 184
structură supramoleculară, 30
Cromatină sexuală
cromatina X, 33, 361
cromatina Y, 34, 361
Cromocentri, 32
Cromomere, 37
Cromozomi artificiali, 39, 150
Cromozom(i) umani, 2, 31
acentrici, 269
acrocentrici, 39
analiză, 38
autozomi, 38
benzi, 37, 42, 44-46
brațe, 39
cariogramă, 43, 53
cariotip, 43, 50, 52
centromer, 38
CGH, 48
clasificare, 53
condensare prematură, 189
constricții, 39, 41
cromatide, 38-39
cromatide surori, 38
derivativi, 275
dicentrici, 277
double minute, 278, 595
FISH, 47
formare, 38
gonozomi, 38
heteromorfism, 293
ideogramă, 43
indicații studiu, 360
inelari, 270
marcaj G, Q, R, T, C, 44-46
marker, 273, 294, 641
matrice/schelet, 36
metacentrici, 39
metode de obținere, 42
microrețele, 50
minusculi, 278
MLPA, 49
morfologie, 38
nomenclatură, 53
omologi, 38
Philadelphia, 278, 589
pictură, 48
regiuni, 53
sateliți, 41
situsuri fragile, 41
SKY, 48
submetacentrici, 39
telomere, 40-41
tehnici analiză, 42-50
tipuri, 39
Y, 311, 411
Crossing-over, 60-61, 195
inegal, 65, 201
Culoarea pielii, 234
Culturi de limfocite, 42
CYP1A1, 327
CYP21, 66
CYP2C19, 329
CYP2C9, 329
CYP2D6, 327, 32

Daltonism, 66
Debilitate mentală, 532

BCU IAȘI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Debrisoquina, 329
Decalarea cadrului de lectură, 248
DECIPHER, 21, 51, 335
Defecte (de)
  câmp de dezvoltare, 517
  congenitale, 515
  lateralitate, 503
  reparare a ADN, 262-266
  septale, 508
  tub neural, 488, 505, 520
  vedere colorată, *v.* daltonism
Deficiența
  acid folic, 488
  adenozin-dezaminază, 542, 549, 668
  alfa-1-antitripsină, 327, 420, 667
  5-α reductază, 535
  21-hidroxilază, 534,
  factorul V Leiden, 214
  galactokinază, 422
  G6PD, 102
  metilen-tetra-hidrofolat-reductază, 326
  sistemul complement, 581
Deficit(e) enzimatic(e), 421
Deformații congenitale, 516
Del, *v.* deleție
Deleții cromozomiale, 269-270
  autozomale, 392
  cromozom Y, 411
  interstițiale, 269
  microdeleții, 394
  submicroscopice, 394
  terminale, 269
Deleții genice, 245, 248
Demetilare, 127-128
Denaturarea ADN, 28
Depleție mitocondrială, 457
Derapare replicativă, 249
Derivă genetică, 305
Despicături labio-palatine, 490
Detoxifiere, 326
Determinism sexual, 524, 527
Deuteranopie, 66
Dezaminări, 246
Dezechilibru de *linkage* (înlănțuire), 62
Dezoxiribonucleotide, 25
Dezvoltarea embrionară, 495
  aparat genital, 518
  căi de semnalizare, 495
  cord, 505-507
  gene implicate, 495, 498
  membre, 509
  ontogenetică, 6
  precoce, 498
  procese majore, 495, 498
  reglare, 498
  specificare axe, 501
  tardivă, 504
  tub neural, 505
DHT, 530
Diabetul zaharat,
  tipul I, 64, 472, 480
  tipul II, 467, 472, 482
  MODY, 482
Diakineză, 198
Diagnostic
  analitic, 355
  cromozomial, 360
  genotipic, 12, 175
  molecular, 363-368
    metode directe, 367
    metode indirecte, 368
  prenatal, 388, 631, 681
    analiza ADN, 645
    analiză cromozomială, 640
    determinări biochimice, 645
    indicații, 632
    probleme bioetice, 645
    tehnici, 640
  preimplantatoriu, 643, 684
  presimptomatic, 630, 684
Diandrie, 204
Dictioten, 201
Didezoxinucleotide, 162
Diferențiere
  celulară, 492
  sexuală, 524, 527, 530
Diginie, 204
Dihidrotestosteron, 530
Dinamică mitocondrială, 466
DIP, 288
Diploten, 198
Dirijare proteine, 121
Discordanță, 231
Discromatopsia, 66
Disgenezie gonadică,
  mixtă, 532
  ovariană, 404
  pură, 412, 532
  testiculară, 532
Disjuncție,
  cromatidiană, 195
  cromozomială, 198
Dismorfologie, 346, 353
Disomie uniparentală, 225, 277
Dispermie, 204
Displazie
  acromesomelică, 496
  campomelică, 496
  congenitală, 516
Disrupții congenitale, 516
Distanță genetică, 175
Distribuție continuă (normală/gaussiană), 233, 235
Distrofia miotonică, 449-450
Distrofia musculară Duchenne, Becker, 103, 433
Distrofia musculară facio-scapulo-humerală, 130
Distrofină, 435
Diversitatea
  imunoglobulinelor, 565, 568
  TCR, 571
Dominant, 59, 100
Dominanță completă, incompletă, 100
Dominant negativ, 258, 418, 433
DOT-blot, 158
D-Page, 167
Drepanocitoza, *v.* sicklemia
Dubla fecundare, 203
Dup, *v.* duplicație
Duplicații
  cromozomiale, 271
  genice, 65
  segmentare, 80, 90, 335

ECA, *v.* enzima de conversie a angiotensinei
ECARUCA, 51
Echilibru
  de înlănțuire, 63
  genetic, 298
Ecogenetică, 322-327
Ecografie fetală, 624, 634
Ectoderm, 500
Editarea ARNm, 109
Efect
  de fondator, 64, 441
  de poziție, 130, 172
  parental, 255, 446
  stocastic, 102
EGFR, *v.* receptori factori de creștere
Elemente
  cis-reglatoare, 133
  genetice mobile, 74
  de răspuns (RE), 70
  transpozabile, 74
Elongația, *v.* procesul de translație
ELSI, 80, 680
Embrion, *v.* dezvoltare embrionară
Embriopatii, 516
ENCODE, 57, 85, 91
Endoderm, 500
Endomitoză, 195
Endonucleaze, *v.* enzime de restricție
Enhancer, *v.* activatori
Ensemble, 21, 79
Entrez, 21
Enzima
  de conversie a angiotensinei, 331
  metabolizare medicamente, 328-329
  de restricție, 146
Enzimopatii, *v.* deficite enzimatice
Epiblast, 500

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Epidemiologie genetică, 298
Epigenetică
  mecanisme, 125
  memorie, 125
Epimutații, 126
Epigenom, 81, 125
Epilepsia mioclonică
  cu fibre musculare roșii, 459
  progresivă, 462
Epistazie, 102, 110
Epitop, 563
Ereditatea
  definiții, 1
  digenică, 259
  monogenică, 208
  multifactorială, 230
  non-mendeliană, 224
  oligogenică, 228, 237
  poligenică, 230
Erori
  distribuție mitoză, 195
  dirijare proteine, 122
  împerechere, 186
  înnăscute de metabolism, 105, 421
  recombinare, 201
  replicare, 186
  segregare, 201
Estriol neconjugat, 625
Etica, 673
  preventivă, 679
Eva mitocondrială, 308, 310, 316
Evoluție
  hominide, 308
  multistadială cancer, 597
Eucromatină, 32
Eufenie, 306
Eugenie, 307, 690
Examn(e)
  citogenetic, indicații, 360
  dismorfologic, 353
  fizic, 353-354
Excluzie alelică, 130, 568
Expansiunea
  repetițiilor trinucleotidice, 254
Explorări genetice, 357-372
Expresia genei, 115
  concepție actuală, 103
  concepție clasică, 97
  inductibilă, 137
  inhibiție, 657
  mecanisme moleculare, 111
  modulare, 668
  monoalelică, 130
  reglare 124
Expresivitate (variabilă), 9, 101, 214
Exon(i), 68
Exosom, 115

Factorul XIII, 443
Factori de coagulare, 444
Factor(i) de creștere, 438, 587
Factori de declanșare a mitozei, 189
Factori de elongație, 113
Factori mutageni, 260
Factori de translație, 113
Factori de transcripție, 73, 135-136, 438, 496, 587
  GATA1, 135
  GLI1, 496
  NF1, 136
  Pit1, 136
  Sp 1, 136
  specific tisulari, 501
  TCF, 496
  VEGF, 608
Factori proteici reglatori
  cis-reglatori, 128
  trans-reglatori, 124
Familia
  LINE, SINE, *Alu*, 89-90
  SLC, 428, 429
  transportori ABC, 428, 430
Familii de gene, 72
  alfa și beta globină, 65, 71
  factori de creștere fibroblastică, 496
  hedgehog, 496
  homeotice, 495, 502
FAP, *v.* polipoza adenomatoasă familială
Febra mediteraneană familială, 217
Fenilcetonuria, 102, 424
Farmacogenetica, 328, 331-342
Farmacogenomică, 328, 331, 342
Fază de înlănțuire, 62
Faze ciclu celular, 188
Fecundarea, 203-204
Fenocopii, 9
Fenom, 81
Fenotip
  Bombay, 110
  definiție, 4, 9
Feritină, 143
Fetopatii, 516
Fetoscopia, 638
Fibre de cromatină, 34-37
Fibrilinopatii, 533
Fibroza chistică, 430, 670
Fidelitatea replicării, 186
Filamente
  de actină, 432
  intermediare, 432
Fisiune mitocondrială, 466
FISH, 47-48, 159
Fitness, 302
FGF, 496, 509
FGF-R, *v.* receptori factori de creștere
Flux genic, 101, 305
Fond comun de gene, 64, 297
Fondator, 64, 441
Fosforilare oxidativă, 455
FoSTeS, 335
Fragmente acentrice, 38
FRAXA, *v.* sindromul X fragil
FRET, 168
Frecvența (de)
  anomalii cromozomiale, 281
  genică și genotipică, 301
  heterozigoților, 300
  mutațiilor genice, 260
  recombinare, 175
Funcția genei, 97
Funcție cognitivă, 548
Furca de replicare, 180
Fus de diviziune, 193, 593
Fuziune
  celulară, 655
  genică, 244
  mitocondrială, 466

GC box, 70
Galactozemia, 422
Gametogeneză
  în general, 196-200
  feminină, 201
  masculină, 200
Gameți, 196
Gangliozidoze, 426
Gastrulație, 500
GDNF, *v.* gena RET
Gemeni, 231, 499
Genă/gene
  alele, 1, 4, 58
  amprentare, 131
  antiproliferative, *v.* gene supresoare a creșterii tumorale
  apoptoză, 601
  ARN 67, 80, 86
  ARNmi, 542, 586
  cadru de lectură, 67
  candidat, 177, 475
  caretaker, 591
  ce codifică proteine, 87
  comune, 71
  definiție clasică, 1, 57
  definiție moleculară, 57, 67, 104--105
  deleții, 65
  domestice, *v.* gene comune
  duplicații, 65
  familii, 65
  frecvența în populație, 297
  funcție, 169
  gatekeeper, 591, 605
  himeră, 588-589
  homeobox, 496, 502
  homeotice, 502
  housekeeping, *v.* gene comune

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

globină, 72
imunității, 564-568
incluse, 69
interacțiuni, 100, 109
intricate, 85
longevitate, 514
master, 130
menajere, *v.* gene comune
metastazare, 604
modificatoare, 101-102, 217, 418, 432
mutator, 186
naștere și moarte, 85
nomenclatură, 97
polimorfism, 58
proliferative, *v.* proto-oncogene
regiuni centrală, laterale, 67-69
reporter, 170
retard mental, 542, 545, 551
rearanjări, 564, 567
simbol, 97
specifice, 71
stabilitate, 586, 591
structură, 67, 84
suprapuse, 85
supresoare de tumori, 586, 590
trunchiate, 72
ubicuitare, *v.* gene comune
unice, 71
Gena
ABO, 110
ABC, 426, 430-431
ABL, 591
ACE, 475
ACH, 97
ADD1, 475
ADRB2, 330
AGT, 475
AMH, 529
APC, 591, 612
APOE, 331
APP, 387, 483
AR, 259
AT1R, 475
ATM, *327*
BBS, 100
BCR, 588, 591
BDNF, 486
BMP, 102
BRCA 1și 2, 591, 606, 612
CBS, 387
CF, 430
CEPP, 475
CLCN1, 428
COL1A2, 259, 418
CYP, 327
DAZ, 411
DAX, 420
DMD, 103, 394, 435
ELN, 394
EMX, 496
FBN1, 99
FSHD, *v.* distrofia musculară facio-scapulo-humerală
FGFR2, 97, 259
FMR1, 41, 551
GALT, 420, 422
globină, 72
HER2NEU, 52
HLA, 574, 576
HMG, 496
HOX, 73, 496, 503, 509
HPRT, 418
IDDM, 480
KCNQ1, 428
LDLR, 441
L1CAM, 259
MECP2, *v.* sindromul Rett
MHC, 574
MYC, 313, 490
NF1, 613
Nodal, 504
PAH, 425
PARK, 484
PAX, 100, 394, 496, 501
PKD1, PKD2, PKD3, 447
PMP22, 420
PTEN, 492, 592
RAS, 588
RB1, 609
RET, 9, 104, 418, 588, 608
SCNN1, 475
SHH, 136, 497
SHOX, 407
SNRPN, 399
SOX, 73, 497, 529
SRY, 529
TBX, 335, 490, 496, 509
TP53, 327, 591, 610
UBE3A, 355, 399
WT1, 100, 396
XIST, 1323
Genetica
comunitară, 3, 379
clinică, 379
dezvoltării, 495
inversă, 169
medicală – definiție, 3, 11, 15, 319, 344, 379
populațiilor, 297
umană, 3, 10, 16
Genofond, 64, 297
Genom(ul) uman
adnotare, 78, 83
baze de date, 21
cartografiere, 65
definiție, 1, 75
mitocondrial, 93-94, 453
nuclear, 75
proiect, 13, 78-80
secvențiere, 78
variante structură, 75
Genome 1000, 13, 82, 290
Genomică, 13, 75, 82
farmacogenomică, 331
in silico, 79
nutrigenomică, 342
toxigenomică, 342
Genomotip, 336
Genotip(uri)
definiție, 4
economic (*thrifty*), 486
frecvența în populație, 297
Globină, 74
Gleevec, 589
Glicosfingolipide, 426
Glisare replicativă, 249, 446
Gonade, 525-530
Gonadotrofina corionică, 625
Gower 1 și 2, 72
GRE, element de răspuns la glucocorticoizi, 70
Grup de înlănțuire, *v.* haplotip
Grup sangvin AB0, 100, 286, 297
Grup sangvin Rh, 286
Gustători, 204
Gută, 419
GWAS, 175, 472-473

H1, H2A, H2AZ, H2B, H3, H4 *v.* histone
Hap Map Project, 81, 290, 473
Haploid, 263
Haploinsuficiență, 418
Haplotip, 60, 473
Harta
genetică, 175
de înaltă rezoluție, 176
de restricție, 147
fizică, 175
Hayflick, 184
HCG, *v.* gonadotrofina corionică
Hedgehog, 496
Helicaze, 180
Hematii în seceră, 107
Hemizigot, 59
Hemizigoție funcțională, 130
Hemofilie, 443, 670
Hemocromatoză ereditară, 63, 579
Hemoglobină
A1 și A2, 72
anormale, 445
embrionare, 72
fetală, 72
Kempsey, 445
S, 107-108, 445
Hemoglobinopatii, 108, 325

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Herceptin, 52, 331
Hermafroditismul adevărat, 204, 532
Heritabilitate, 7, 232, 474
Heterocromatină, 32
Heterocromatinizare, 32
Hetrodisomie, 225, 277
Heterogenitatea secvențelor nucleotidice a ADN, 76
Heterogenitate genetică, 103
Heteromorfism cromozomial, 293
Heteroplasmie, 454
Heterozigot(i), 58, 109, 219
Heterozigot compus, 58, 103, 220, 419
Heterozis, 204
Hetrotaxie, 502
Hibridizare, *v.* și ADN
  acizi nucleici, 145, 155
  fluorescentă *in situ*, *v.* FISH
  inversă, 160
  in situ, 159
  (pe) microrețele, 160
Hibridizare genomică comparativă, *v.* CGH, FISH
Hibrizi
  celulari interspecifici, 175
  moleculari, 28, 46
Hidrocefalie, 489
Himeră, 203
Hipercolesterolemia familială, 441, 671
Hiperfenilalaninemii, 425
Hiperhomocistinemie, 326
Hiperlipoproteinemii, 475
Hiperplazia congenitală de suprarenală, 579
Hipertensiune arterială, 472, 475
Hipertermia malignă, 331
Hipogonadism, 404, 407
Hipospadias, 536
Hipotiroidie congenitală, 628
Histone, 27, 35, 126-128
  acetilare, 128
  fixare la ADN, 23
  inactivarea ADN, 26
  metilare, 128
  modificări epigenetice, 128
  structură, tipuri, roluri, 33
HIV, 322
HLA, 574-577
HMG, *v.* proteine nehistonice
HNPC, 263, 610
Holoprozencefalia, 497
Homocistinuria, 667
HOTAIR, 129
HSR, *v.* regiuni colorate omogen
Holandric, 220
Homeodomeniu, 496
Homeostazie, 320
Homo erectus, habilis, sapiens 310
Homocisteina, 326, 475
Homoplasmie, 454
Homozigot, 57
Hormon(i)
  androgeni, 535
  anti-müllerian, 525, 530
  peptidici, 438-439
Housekeeping genes, *v.* gene comune HUGO, 21
Human variom, 290

Identitate sexuală, 527
Idiogramă cromozomi, 54
Imortalizarea celulelor tumorale, 598
Implantare, 500
Imunitate adaptativă, înnăscută, 561
Imunodeficiență combinată severă, 581, 670
Imunodeficiențe, 581
Imunoglobuline, 561-564
Imunostimulare/imunosupresie cancer, 603
Inactivare
  cromozom X, 131
  gene, 170-172
Indels, 291-292
Intoleranță la lactoză, 324
Indice de fertilitate, 303
Individualitate biologică, 3, 17
Individualitate genetică, 3
Inflamație tumorală, 602
Informație genetică, 26, 29
Inginerie genetică, 11, 19, 647
Inhibitorii transcripției, 71
Insensibilitatea la androgeni, 535
Inserții cromozomiale, 276, 371
Inserții nucleotidice, 245, 248
Instabilitate
  cromozomială, 278, 591, 598
  genetică, 598
  meiotică, 254, 283
  microsateliților, 263, 598, 611
  mitotică, 254
Insule CpG, 85, 127, 246
Insulators, *v.* secvențe izolatoare
Interacțiunile genei, 100-101, 109
Interactom, 81
Interfază, 188
Internet, genetică, 20
Intracorpi, 651
Intron(i), 68
Invazie și metastazare, 604
Inversie, 271, 292, 371
Inversiune sexuală, 420
Ipoteza
  celor două evenimente, 590
  Lyon, *v.* cromatina X
  Out of Africa, 311, 315
ISCN, *v.* nomenclatura cromozomilor
IVS, *v.* introni
Izocromozomi, 195, 272
Izodisomie, 225, 277
Izoforme
  ADN, 30
  proteine, 139
Izolate, 301
Izolatori, 130, 133
Izotipuri, 567

Îmbătrânirea *v.* senescență
Înălțime, 233
Încrucișare asortativă, 301
Încrucișare consangvină, 302
Încrucișare cromozomială, 60, 197
Înlănțuire genică, 59, 62, 73-74
Întârziere anafazică, 195

JAK-STAT, 137

Keratinopatii, 432-433
Kinaza
  „Jak", 137
  MEK-MAPK-ERK, 137
  Kinaze ciclin/dependente, 190
  KIP, 190
  Kinetocori, 40, 194
  Knockout, 83, 170
  KSS, *v.* sindromul Kearns-Sayre

Laminină, 31
Laminopatii, 433
Lanț respirator, 454
Lanțuri imunoglobuline, 563-564
LCR, *v. locus control region*
LDL, 441
Legea (legile)
  complementarității, 27
  Hardy-Weinberg, 299-301
  Mendel, 204-208
Leptină, 486
Leptoten, 197
Leucemia mieloidă cronică, 589
Leucodistrofii, 427
Leydig, celule, 530
LHON, 462-464
Leber, 462
Liganzi, 137
Limfocite B, T, helper, citotoxice, 561, 563, 573
LINE, *v.* secvențe nucleotidice
Linkage, 59, 62
Linia primitivă, 505
Liposomi, 660
Locus/loci, 57
Locus Control Region, 71, 136

COPYRIGHT UNIVERSITY LIBRARY

LOD, *v.* scorul LOD
Longevitate, gene, 514
LOH, *v.* pierderea heterozigoției
LOI, *v.* pierderea amprentării
LUCA, 123
Luxația congenitală de șold, 491
Lyon, ipoteza, *v.* cromatina X

Macroleziuni ADN, 256
MAIS, 535
Malarie, 322, 325
MALDI, 166
Manipulare genetică, 161-170
Malformațiile congenitale, 516
  de cord, 490, 508
  izolate, 487, 587
  membre, 510
  multiple, 587
  tub neural, 488
MammaPrint, 332
Marcaj cromozomial, 42
Marfan, *v.* sindromul Marfan
Markeri
  cromozomi, 641
  ecografici fetali, 637
  moleculari cancer, 616
MASA, 545
Matisare
  descriere, 109, 115, 139
  alternativă, 69, 109, 115, 140
Matriță, *v.* ADN
MCC, 191
Medicina
  genomică, 3, 19, 80, 319, 340-343
  moleculară, 11, 417
  personalizată, 4, 13, 95, 340
  predictivă, 4, 13, 341
  sistemelor, 13
  stratificată, 341
Megacolon congenital, *v.* boala Hirschprung
Memorie
  epigenetică, 125, 186
  imunologică, 561
Meioza, 197-198
Membrane extraembrionare, 499
Mendel, 10, 23, 204
MEN2A și MEN2B, 104, 418, 608
Meningocel, *v. spina bifida*
Meningomielocel, *v. spina bifida*
MERF, 462-464
Metabolizatori lenți, 328
Metabolom, 81, 342
Mesager secund, *v.* AMPc
Metacentrici, *v.* cromozom
Metafaza
  mitozei, 193
  meiozei I, 198
  meiozei II, 199
Metilare, 126-128
Metastazare, 604
Metoda
  hibrizi drojdii, 166
  secvențiere Sanger, 162
  de transfer Southern, 157
  de transfer Western, 166
Mezoderm, 500
MHC, *v.* complexul major de histocompatibilitate
Microdelеții, 394-404, 411
Microduplicații, 394-395
Microleziuni, 256
Microrețele
  ADN, 367
  ARN, 166
  CGH, 161
  proteine, 166
Micronuclei, 195
Microsateliți, 76, 88, 291
Microtubuli, 432
Migrații, 244, 305, 315
MIN, *v.* instabilitatea microsateliților
Minisateliți, 76, 88, 291
Miopatie, *v.* distrofie musculară
Miopatii mitocondriale, 463
Mirtoni, 142
Mismatch, *v.* erori de împerechere
Mitocondrii,
  genom, 93, 453
  biogeneză/funcții, 453-454
Mitogene, *v.* proto-oncogene
Mitoza, 193-195
MLPA, 49
MMR, 263
Moarte celulară programată, *v.* apoptoza
Modele animale, 171
Modificarea dirijată a materialului genetic, 169
Modificări post-translaționale ale proteinelor, 122
Modificări epigenetice, 126
MODY, *v.* DZ tip II
Molă hidatiformă, 204
MoM, *v.* multiplu al medianei
Mononucleotide, *v.* SNP
Monosomie, 268
Monosomia X, *v.* sindromul Turner
Morfolino, 170
Morula, 498
Mozaicism
  cromozomial, 269
  germinal/gonadic, 227
  limitat la placentă, 641
  somatic, 227
MSH2, MSH3, MSH6, 262
Mucoviscidoza, *v.* fibroza chistică
Mucolipidoze, 122, 426
Mucopolizaharidoze, 426
Multifactorial, 230
MURCS, asociație, 518
Mutații
  ADNmt, 93, 465
  câștig de funcție, 258, 418
  clasificare, 241
  complete, 254, 446, 550
  cromozomiale, 241
  definiție, 1, 241
  dinamice, 225, 253
  dominant negative, 258
  frameshift, 118, 248
  genice, 241, 244, 256, 260
  genomice, 241
  germinale, 213, 241
  induse, 242, 260
  instabile, 225, 253
  missense, 118, 247
  mitocondriale, 93, 465
  neutre, 242
  noi, 223
  nomenclatură, 245
  nonsens, 118
  pierderea funcției, 258, 418
  rată, 80
  sens greșit, 118, 247
  silențioase, 117, 247
  sinonime, 247
  somatice, 8, 241
  spontane, 241
Mutageneză aleatorie, 173
Mutageneză dirijată, 173

NAHR, 335
Nedisjuncție, 282
  cromatidiană, 195
  cromozomială, 202, 282
  meiotică, 202, 282
  mitotică, 117, 282
Negustători, 7
Neoplazie endocrină multiplă, *v.* MEN2
NER, *v.* repararea ADN
Neurocristopatii, 505-506
Neurofibrină, 613
Neurofibromatoză tip 1, 613
Neurofibromatoză tip 2, 614
Neuropatie motorie și senzorială ereditară, *v.* boala Charcot-Marie-Tooth
Neuropatie ereditară cu predispoziție la pareze presionale (HNPP)
Neuropatie optică Leber, 462
Neurulație, 498
NF1, *v.* neurofibromatoza
NHEJ, 265, 335
Nodul Hansen, 498

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Nomenclatura
cromozomilor, 53
mutațiilor, 245
NOR, *v.* tehnici analiză cromozomi
Northern blot, 158
Notocord, 498
Nucleotid, 25
Nucleozid, 25
Nucleozom, 36, 126
Nutrigenomică, 342

Oameni arhaici, 309
Obezitatea, 486
Oftalmoplegie externă cronică progresivă, 458
Okazaki, piese, 183
Oligogenie, 228, 237
Oligonucleotide antisens, 170, 660
OMIM, 6, 21, 208
Oncogene, 586
Operon, 124
ORF- v. cadru de lectură
Organisme model, 170
Originea
populațiilor umane, 309
vieții, 122
Ori – origini de replicare, 181
Organogeneza, 505
Orphanet, 21
Osteogenesis imperfecta, 419, 436
Out of Africa, 311, 315
Ovare, formare, 526, 530
OXPHOS, *v.* fosforilare oxidativă

Pahiten, 197
PAIS, *v.* insensibilitatea la androgeni
Paleo-antropo-genetică, 314
Panmixie, 298
PAPP-A, 626
Paratop, 563
Pb – perechi de baze, 26
PCR, 152, 154, 156, 166
PCNA, 180
Pedigree, *v.* arbore genealogic
Penetranță, 101, 211
Peptidil-transferaza, 120
Pericentrină, 156
Persistență ereditară a hemoglobinei fetale, 420, 445
Picior strâmb congenital, 491
Pierderea
amprentării (LOI), 131
funcției, 258
gene, 313
heterozigoției, 590-591
Pierre-Robin, *v.* secvența
Pigmentația pielii, 234
Placentă, 499
Plasmide, 149
Plasmocite, 561
Plectonemic, *v.* catene
Pleiotropie, 99
Poliadenilare alternativă, 141
Polialelie, 58
Polichistoză renală tip adult, *v.* ADPKD
Polifenie, *v.* pleiotropie
Poligenie, 98, 230
Polimorfism
acetilare, 330
ADN, 95, 286
alfa-1-antitripsină, 286, 327
APOE, 331
ARNmi, 95, 142
ARNnc, 88, 95, 293
genetic, 285, 471
grupului sangvin AB0, 286
grupului sangvin Rh, 286
HLA, 574
inversii, 292
lungimii fragmentelor de restricție, *v.* RFLPs
minisateliților, 293
microsateliților, 293
mononucleotidic (SNPs), 289
proteice, 285
receptori, 330-331
proteine de transport, 371
translocații, 292
Poliploidii, 268
Polipoza adenoamtoasă colică familială, 418, 611-612
Poliribozom, 119
Polisomii X, 409
Pompe ionice, 428
Populație, 305
Populații umane, origine, 307
Porfiria variegata, 306
POSSUM, 21
Potențial genetic, 7
Potter, *v.* secvența
Predispoziție genetică, 7, 324, 334, 471, 519
Premutație, 254, 446
Primer, *v.* amorsă
Primate, 312
Proband, 208
Probabilitate, *v.* teoremele probabilității
Proces de translație, 118
Procese cognitive, 543
Profilaxia bolilor genetice, 619
Profil de expresie, 159, 332
Proiectul
Genom 1000, 290
genom uman, 13, 57, 75, 78-80, 82
Hap Map, 290
Profaza
mitozei, 193
meiozei I, 197
meiozei II, 198
Program depistare boli genetice, 301
Prometafază, 193
Promotor, 69, 107, 112, 172
Pro-opiomelanocortină, 486
Proto-oncogene, 586
Protecția corpului uman, 689
Protecția speciei umane, 689
Protecția vieții umane, 689
Proteina(e)
canal ionic, 428-429
cărăuș, 428
CENP, 40
CLIP, 40
CFTR, 430
chaperones, 122
citoschelet, 432
dirijare, 121
histonice, 35
matrice extracelulară, 433
menajere, 421
membranare, 433
modificări post-translaționale, 122
morfogenetice osoase, *v.* BMP
mutator, 263
nehistonice, 35
placentară A asociată sarcinii (PAPP-A), 626
recombinante, 647
semnalizare intercelulară, 439
structură, 105-106
transducție a semnalului, 438, 440
de transport, 428
Proteom, 81
Protanopie, 66
Pseudodominanță, 218
Pseudohermafroditism feminin
hiperplazia congenitală de suprarenală, 534
nonadrenalian, 534
prin deficit 21-OH, 531
Pseudohermafroditismele masculine, 535
Pseudogene, 71, 85-86
Psihoze, 484
afectivă bipolară, 485
schizofrenia, 484
Puncte de control ciclu celular, 191--192

Quadruplu test, 625
QF-PCR, 50

Rad, 261
Radiații ionizante, 260-261

BUMF / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Radiografie fetală, 632
Rahitism hipofosfatemic/rezistent la vitamina D, 224
Rase umane, 316-317
RASopatii, 490
Rata mutațiilor, 80, 260
Răspuns imun, 562
RE, *v.* elemente de răspuns, 63
Receptori, 438
androgeni, 535
pentru antigen al celulei T, 571
pentru antigene, 561
citokinic CCR5, 322
DRD2, 486
EGF, 124
estrogenici, 616
HER2, 331
hormonali, 73
LDL, 124, 441
membranari, 136
nucleari de hormoni, 73, 137
RTK, 136
Recesiv, 59, 419
Recombinanți, 61
Recombinare
cromozomială, 243
genetică, 242
genică
aberantă, 244
neomologă, 250
omoloagă, 61, 197, 244, 265
omoloagă nealelică/inegală, 201, 250
genomică, 242
intercromozomială, 198, 243
intracromozomială, 197, 243
somatică, 125
Reconfigurarea genomului, 125
Registre genetice, 631
Regiune
colorate omogen, 594
hipervariabilă, 561
omoloage, paraloage, 335
pseudoautozomale, 221
Reglare sintezei proteinelor
post-transcripțională, 140
pre-transcripțională, 125
trancripțională, 133
translațională, 142
Remaniere
cromatiniană, 514
genomică, 253
Renaturare, *v.* ADN
Repararea ADN, 30, 262-265
Repertoriu imunologic, 564
Repetiții trinucleotidice, 253, 446
Replicarea ADN, 1, 30, 179-184
Repliconi, 148, 180
Replizom, 180
Restricție (punct de), 190
Retardul mental, 492
clasificare, 539
definiție, 540
diagnostic, 554-555
etiologie, 540-542
nespecific, 544, 552
prevalență, 540
profilaxie, 540
RMLX, 540-545
sindromic, 544, 547
sfat genetic, 558
teste, 558
Retinită pigmentară, 103
Retinoblastom, 608
Retrotransposoni, 74, 88, 90
RFLPs, 95, 148, 158, 289
Ribozime, 123, 660
Ribozom, 118
Riboswitch, 68
Risc genetic
anomalii cromozomiale, 371
boli cromozomiale, 371
boli monogenice, 372
boli multifactoriale, 378
empiric, 237, 487, 491
RFLPs, 69, 248, 312
RMN fetal, 637
RPA, RPC, 180

Sarcoame, 587
Sateliți, *v.* cromozom
Schița genomului uman, 78
SCE, 189
Scorul LOD, 175
SCID, *v.* imunodeficiciența combinată severă
Schimb cromatide surori, 189
Schizofrenia, 485
SCOS, 348
Screening-ul populațional al
boli genetice, 620-629
bioetică, 623, 687
criterii, 621
familial, 629
heterozigoți, 629
neonatal, 627
fenilcetonurie, 628
hipotiroidie congenitală, 628
prenatal, 623
Secretori, 103, 109
Securine, 195
Secvențe malformative, 517, 533
Secvențe de aminoacizi, 109
Secvențe nucleotidice
analiză, 161
izolatoare, 130, 133
LINE, 74
repetitive, 74
(de) replicare autonomă, 39
SINE, 74
Secvențierea ADN, 161-164
Segregare
cromatidiană, 194
independentă, 58
replicativă, 454
Selecție, 303-304
Selectarea promotorilor, 139
SELEX, 169
Semidominanță, 211
Semnal peptidic, 121
Semnătură genetică, 332
Senescență, 513
mutații ADNmt, 465
scurtare telomere, 185, 514
Separază, 195
Serpine, 386
Servicii de genetică, 379
Sex genetic, 203, 524
Sex-ratio, 203
Sexualitate, 524
Sexualizare, 441
anomalii, 531-536
control genetic, 527
determinism sexual, 524
diferențiere sexuală, 527
formarea gonadelor, 524
Sheltrin, *v.* telomere
Sfat genetic, 368-379, 468, 558
anomalii cromozomiale, 371
bioetică, 677
boli autozomal dominante, 373
boli autozomal recesive, 375
boli cromozomiale, 371
boli monogenice, 372
boli multifactoriale, 378
boli recesive legate de X, 376
definiție, 368
circumstanțe, 368
citopatii mitocondriale, 468
(în) diagnosticul prenatal, 631
principii, 368, 370
probleme, 368
retard mental, 558
Sferocitoza ereditară, 437
Sfingolipidoze, 426
Shh, *v.* sonic hedgehod
Sicklemia, 107, 668
Silancer, *v.* inhibitorii transcripției
Sinapsă, 196
Sindactilie, 510
Sindroamele genelor contigue, 394
Sindroame cu deleții autozomale, 392
Sindroame de instabilitate cromozomială, 278
Sindroame cu microdeleții, *v.* sindroamele genelor contigue
Sindroame malformații cord, 508
Sindroame malformații membre, 509
Sindroame cu retard mental, 548

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sindroame cu scurtare telomere, 184
Sindromul 47,XYY, 410
Sindromul adreno-genital, *v.* deficiența în 21-hidroxilază
Sindromul Aarskog, 546
Sindromul Alagille, 508
Sindromul alcoolismului fetal, 551
Sindromul Angelman, 131, 136
Sindromul Apert, 514
Sindromul ATRX, 132
Sindromul Bardet-Biedl, 100
Sindromul bărbați XX, 531
Sindromul Beckwith-Wiedeman, 131, 136
Sindromul Catch-22, *v.* sindromul velo-cardio-facial
Sindromul Char, 508
Sindromul Coffin-Lowry, 546
Sindromul *Cri du chat*, 392
Sindromul Crouzon, 259
Sindromul dependenței de alcool, 486
Sindromul DiGeorge, *v.* sindromul velo-cardio-facial
Sindromul Down, 384-390, 623-625
Sindromul Edwards, *v.* trisomia 18
Sindromul Ehlers-Danlos, 103, 437
Sindromul feminizare testiculară, 533
Sindromul Gorlin, 496
Sindromul Holt-Oram, 490, 508, 510
Sindromul Hunter, 427
Sindromul Hurler, 104, 426
Sindromul Hutchinson-Gilford, 185, 515
Sindromul ICF, 132
Sindromul insensibilitate la androgeni, 535
Sindromul Jackson-Wiess, 510
Sindromul Kallman, 412
Sindromul Kartagener, 412, 503
Sindromul Kearns-Sayre, 460-464
Sindromul Klinefelter, 407-409
Sindromul Lesh Nyhan, 419
Sindromul LHON, 458
Sindromul Li-Fraumeni, 609
Sindromul Lynch, 610
Sindromul Marfan, 99, 508
Sindromul MASA, 259
Sindromul Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser, 410
Sindromul mână-picior-organe genitale, 514
Sindromul MELAS, 462-464
Sindromul Menkes, 546
Sindromul MEN2A, 104
Sindromul MERF, 462
Sindromul Morris, 533
Sindromul Morquio, 427
Sindromul NARP, 462-464
Sindromul Noonan, 508
Sindromul Pallister-Hall, 510
Sindromul Patau, 3913
Sindromul Pearson, 460, 463
Sindromul persistenței ductelor mülleriene, 536
Sindromul Pierre Robin, *v.* secvența Robin
Sindromul Pfeiffer, 259, 510
Sindromul Prader-Willi, 131, 136, 399
Sindromul QT-lung, 428
Sindromul Reifenstein, 534
Sindromul Rett, 130
Sindromul Rubinstein-Taybi, 132
Sindromul Sanfilippo, 427
Sindromul Scheie, 104
Sindromul Silver Russell, 132
Sindromul Smith-Lemli-Opitz, 497
Sindromul SOTOS, 177
Sindromul Townes-Brokes, 510
Sindromul Turner, 404-407
Sindromul testiculelor absente, 532
Sindromul unghii-rotulă, 510
Sindromul velo-cardio-facial, 396, 508
Sindromul WAGR, 100
Sindromul Waardenburg, 496, 502
Sindromul Werner, 185, 515
Sindromul Williams, 402-404, 508
Sindromul Wolf Hirschorn, 393
Sindromul X fragil, 550-558
Sindromul Zellwegwer, 427
SINE, *v.* secvențe nucleotidice
Sintenie, 175
Sister chromatide exchange, *v.* SCE
Situs (de)
  acceptor, 115
  donor, 115
  inițiere a transcripției (SIT), 67-69
  inversus, solitus, ambiguus, 503
  fragil, 39
  poliadenilare, 69, 114
  restricție, 147
  terminare a transcripției, 113
SKY, *v.* FISH
Slot-blot, *v.* ASO
SMA, *v.* atrofia musculară spinală
SMART, 164
SNPs, 79, 95, 288-289, 472
Sociobiologie, 5
SOLID, 164
Sonde
  pentru FISH, 46
  genotipice, 156
  oligonucleotidice specifice unei alele, 158
Sonic hedgehog, 496
Southern blot, *v.* metoda de transfer Southern
Specificarea axelor, 502
Specii gen Homo, 309
Spectrină, 432, 437
Spermatogeneză, 199
Splicing, *v.* matisare
Spliceosome, *v.* matisare
Spina bifida, 488
SRA- sistemul renină-angiotensină, 477
SRY, 527
SSRs – repetiții de secvențe simple, 76, 95, 291
SST, 67
STR, 291
STS, 92
Stări intersexuale, 531-536
Stenoza
  aortică supravalvulară, 508
  apeductului Sylvius, 489
  pilorică hipertrofică juvenilă, 491
Sterilitate, 410
Stenoză aortică supravalvulară, 508
Structura proteinelor, *v.* proteine
Stres oxidativ, 514
Studii
  adopție, 194
  asociere, 472
  caz-control, 473
  cohortă, 474
Submetacentrici, *v.* cromozom
Substituție nucleotidică, 246-248
Susceptibilitate la boală, *v.* predispoziție
Superfamilii de gene, 72
  imunoglobulinelor, 73
  receptori nucleari hormoni, 73

Șanțuri laterale, *v.* ADN
Șoareci transgenici, 170

Talasemie, 445
TAR, *v.* telomere
TATA-box, 70
Talia, *v.* înălțimea
TCR, 571
Tehnici de marcaj cromozomial, 44-46
Telofaza
  meiozei I și II, 198
  mitozei, 193
Telomere
  funcții, 40
  structură, 40,
  replicare, 183
  senescență, 183, 514
Telomerază, 41, 183
  acțiune, 185
  cancer, 185

UMF IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

reactivare, 185
senescență, 183
TERT și TERC, 41
Teorema probabilităților, 372
Terapie celulară, 669
Terapie genică, 661-669, 688
Teratogeni, 519-521
Teratom ovarian, 204
Test(e)-testare
bioetică, 680
funcționale, 472
genetice, 357-360, 685
Guthrie, 628
integrat, 625
predispoziție, 685
presimptomatic, 684
triplu, 625
TORCH, 519
Testicule, formare, 525, 529
Testicule necoborâte congenital (TNC), 536
TF, *v.* factori de transcripție
TGF-b, 496
Toleranță imunologică, 561
Tolerarea leziunilor ADN, 266
Topoizomeraze, 180
TORCH, 519
Trans, *v.* faze de înlănțuire
Transcripție, 29, 111, 113
Transcripție inversă, 29
Transcriptază inversă, 68, 129
Transducția semnalului, 137, 440
Transdiferențiere, 656
Transfecție, 149, 586
Transfer nuclear, 654, 658
Transformare
bacteriană, 24
genetică, 148, 151
Transgenă, 170
Transgenice, *v.* animale transgenice
Translație, 111, 116, 119
Translocație, 273-275, 371, 500, 594
Transmitere
autozomal dominantă, 212
autozomal recesivă, 218
holandrică, 221
legată de sex, 220
legată de X recesivă, 186
legată de X dominantă, 188
maternală, 225
monogenică, 208
Transportori ABC, 428, 430
Transposoni, 74-75, 88, 90
Transpoziție, 74, 88
Transversie, 208
Tranziție, 246
Tratamentul bolilor genetice, 647
Triploidie, 268
Triplet, *v.* codon
Triplul test, 625
Trisomia 21, *v.* sindrom Down
Trisomia 18, 391
Trisomia 13, 391
Trisomia X, 409
Trisomia XYY, 410
Trisomie, 233
Tromboze venoase profunde, *v.* deficiența în factorul V
Tub neural, 505
Tuberculoză, 322
Tulburări
epigenetice, 133
producere energie, 423
reproducere, 410
sinteză hormoni, 423
Tumoră, 586
Tumorigeneză, 586

Uciderea celulelor canceroase, 657
uE3, *v.* estriol neconjugat
Unicitate biologică, 4, 6
Uniuni asortative, 301
UTR, 60

Vaccinuri recombinante, 651
Variabilitatea genetică, 241-246
definiție, 241
farmacocinetică, 328
farmacodinamică, 330
Variante genetice, 475
VATER, asociație, 518
Vârsta maternă, 201, 623
Vectori
clonare, 148
expresie, 151
navetă, 151
terapie genică, 659
VNTR, *v.* minisateliți
VNDR, *v.* microsateliți

XIC, *v.* centru de inactivare
XIST, 129
Xeroderma pigmentosum, 327

YAC, *v.* cromozomi artificiali

Western blot, 166
WGAS, 161
Warfarină, 332

Z(Θ), *v.* scorul LOD
Zigot(ul), formare, 3

Biblioteca Centrală Universitară
BIBLIOTEKA DE MEDICINĂ
Cota veche 99
Preţul lei

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În colecţia **BIOS**

au apărut:

Evelina Moraru – *Hepatita cronică la copil*
Ioan Bostaca, Viorica Dobrovici – *English in Medicine. A Text Book for Doctors, Students in Medicine and Nurses*
Vasile Astărăstoae, Almoş Bela Trif – *Responsabilitatea juridică medicală în România. Premise pentru un viitor drept medical*
Mihai Pricop – *Oncologie ginecologică clinică*
Ioan Bostaca, Eduard Dabija – *Dicţionar de medicamente în cardiologie 2000*
Ostin C. Mungiu – *Algeziologie specială*
Gabriel Ungureanu, Maria Covic – *Terapeutică medicală*
George I.M. Georgescu, Cătălina Arsenescu – *Tratamentul raţional al bolilor cardiovasculare majore*
Ioan Bostaca – *Diabetul zaharat* (ediţia a IV-a)
Simona Stolnicu, Doiniţa Rădulescu, Simona Mocan – *Atlas color de histopatologie* (în format electronic, pe CD)
Grigore Tinică, Eugen Săndică – *Risc şi beneficiu în revascularizarea chirurgicală a miocardului*
Ostin C. Mungiu, Dunărea G. Ionescu, Victor Diaconescu – *Evaluarea durerii. Algeziologie experimentală*
Vasile Astărăstoae, Gheorghe Scripcaru, Petru Boişteanu, Vasile Chiriţă, Călin Scripcaru – *Psihiatrie medico-legală*
A. Hufschmidt, C.H. Lucking – *Neurologie integrală. De la simptom la tratament*
Ostin C. Mungiu – *Tratat de algeziologie*
Ostin C. Mungiu, Cristina-Maria Gavrilescu – *Farmacoepidemiologie*
Vasile Astărăstoae, Ortansa Stoica – *Genetică* versus *bioetică*
Aurel Ivan – *Tratat de epidemiologie a bolilor transmisibile*
Ioan Bostaca, Carol Marcu – *Diagnostic electrocardiografic*
Simona Stolnicu, Doiniţa Rădulescu, Simona Mocan, Lucian Puşcaşiu – *Patologia colului şi a corpului uterin*
Eugen Tarcoveanu – *Tehnici chirurgicale*
Mircea Covic, Dragoş Ştefănescu, Ionel Sandovici – *Genetică medicală*
Adrian Covic, Paul Gusbeth-Tatomir, Liviu Segall – *Afectarea cardiovasculară în boala renală cronică*
Iuliana Popovici, Lăcrămioara Ochiuz, Dumitru Lupuleasa – *Terminologie medicală şi farmaceutică*
Maria Covic, Adrian Covic, Paul Gusbeth-Tatomir, Liviu Segall – *Manual de nefrologie*
Dumitru Lupuleasa, Iuliana Popovici – *Tehnologie farmaceutică* (volumul 2)
Eusebie Zbranca – *Endocrinologie. Ghid de diagnostic şi tratament în bolile endocrine*
Dumitru Lupuleasa, Iuliana Popovici – *Tehnologie farmaceutică* (volumul 3)
Dumitru Lupuleasa, Iuliana Popovici – *Tehnologie farmaceutică* (volumul 1, ediţia a III-a)
Dumitru D. Brănişteanu – *Tulburările de creştere. Ghid de diagnostic şi tratament*
Mircea Covic, Dragoş Ştefănescu, Ionel Sandovici – *Genetică medicală* (ediţia a II-a)

9 789734 619603

www.polirom.ro

Corector: Valentin Piftor
Tehnoredactor: Radu Căpraru

Bun de tipar: mai 2011. Apărut: 2011
Editura Polirom, B-dul Carol I nr. 4 • P.O. BOX 266
700506, Iaşi, Tel. & Fax: (0232) 21.41.00; (0232) 21.41.11;
(0232) 21.74.40 (difuzare); E-mail: office@polirom.ro
Bucureşti, Splaiul Unirii nr. 6, bl. B3A, sc. 1, et. 1,
sector 4, 040031, O.P. 53 • C.P. 15-728
Tel.: (021) 313.89.78; E-mail: office.bucuresti@polirom.ro

Tiparul executat la S.C. LUMINA TIPO s.r.l.
Str. Luigi Galvani nr. 20 bis, Sect. 2, Bucureşti
Tel./Fax: 211.32.60, 212.29.27, E-mail: office@luminatipo.com

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY